

**Einfluss einer 24-stündigen Behandlung von ventrikulären neonatalen
Kardiomyozyten mit einem Adipozyten-konditionierten Medium auf
Hypertrophie-assoziierte Signalwege und Zellproteine**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Florian Gerhardt
Geburtsdatum / Geburtsort: 05.12.1989 in Potsdam

angefertigt am / in: Klinik für Herzchirurgie
Herzzentrum Leipzig, Universität Leipzig
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Friedrich W. Mohr
Strümpellstraße 39, 04289 Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Stefan Dhein

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 28.02.2017

gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Bibliografische Beschreibung	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Übergewicht und Adipositas.....	1
1.1.1 Übergewicht und Adipositas als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen	2
1.1.2 „Obesity Paradox“	3
1.2 Fettgewebe und Adipozytokine	4
1.2.1 Aufbau und Funktion von Fettgewebe	4
1.2.2 Adipozytokine und deren Funktionen	5
1.2.3 Veränderung im Fettgewebe bei Übergewicht	7
1.2.4 Adipozytokine als Mediatoren kardiovaskulärer Erkrankungen	9
1.2.5 Adipozytokine und deren Wirkung auf Kardiomyozyten	11
1.3 Signaltransduktion in kardialer Hypertrophie	12
1.3.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs)	13
1.3.1.1 Extrazellulär Signal-regulierte Kinasen (ERKs)	14
1.3.1.2 P38-MAPKs und c-Jun N-terminale Kinasen	14
1.3.2 Calcineurin/Calmodulin	15
1.4 Aufgabenstellung	16
2 Materialien	17
2.1 Allgemeine Geräte	17
2.1.1 Geräte für die Zellkultur	18
2.1.2 Geräte für die biochemischen Analysen.....	18
2.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel	19
2.2.1 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel für die Zellkultur	20
2.2.2 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel für die biochemischen Analysen.....	21
2.3 Allgemeine Chemikalien	22
2.3.1 Biochemikalien für die Zellkultur	23
2.3.2 Medikamente	24
2.3.3 Chemikalien für die biochemischen Analysen	24
2.3.3.1 Antikörper für die biochemischen Analysen	25
2.3.4 Chemikalien für die Histologie und Immunhistologie	27

2.3.4.1 Antikörper für die immunhistologischen Untersuchungen	27
2.4 Tiere.....	29
2.5 Zellkulturmedien	29
2.6 Lösungen und Puffer.....	31
2.6.1 Lösungen und Puffer für die Zellkultur	31
2.6.2 Lösungen und Puffer für die Histologie und Immunhistologie.....	33
2.6.3 Lösungen und Puffer für die biochemischen Analysen.....	35
2.6.3.1 Protease-Inhibitoren	35
2.6.3.2 RIPA-Stocklösung und RIPA-Lysepuffer.....	35
2.6.3.3 Lösungen und Puffer für die SDS-Page	38
2.6.3.4 Lösungen und Puffer für den Western-Blot	40
2.7 Kommerzielle Kits	43
2.8 Computersoftware.....	43
3 Methoden.....	44
3.1 Zellkultur	44
3.1.1 Präparation von ventrikulären Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten	44
3.1.2 Präparation von Adipozyten aus dem Nebenhodenfettpolster der männlichen adulten Ratte.....	46
3.1.3 Gewinnung des Kardiomyozyten-konditionierten Mediums	48
3.1.4 Gewinnung des Adipozyten-konditionierten Mediums	49
3.1.5 Behandlung der ventrikulären Kardiomyozyten	50
3.1.6 Ermittlung der Schlagfrequenz von ventrikulären Kardiomyozyten	51
3.2 Histologie.....	52
3.2.1 Connexin-43- und Troponin-I- Immunfluoreszenz- Doppelfärbung	52
3.2.2 Oil-Red-O-Färbung	54
3.3 Biochemische Untersuchungen	55
3.3.1 Proteinextraktion	55
3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	56
3.3.3 Probenvorbereitung	57
3.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-Page	58
3.3.5 Western-Blot	60
3.3.6 Membranfärbung	61
3.3.7 Antikörperbehandlung.....	62
3.3.8 Detektion	64

3.3.9 Densitometrische Auswertung	64
3.3.10 Stripping	65
3.4 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest, ELISA.....	66
3.5 Statistik.....	68
4 Ergebnisse	69
4.1 Isolation und Kultur neonataler ventrikulärer Kardiomyozyten.....	69
4.1 Connexin-43- und Troponin-I-Immunfluoreszenz Doppelfärbung	70
4.3 Ermittlung der Schlagfrequenzen.....	73
4.4 Isolation und Kultur von Adipozyten aus dem Nebenhodenfettpolster der männlichen adulten Ratte.....	76
4.5 Biochemische Untersuchungen	77
4.5.1 Expression von Connexin-43	77
4.5.2 Expression von β -Aktin.....	81
4.5.3 Expression von p-ERK/ERK-1/2	85
4.5.4 Expression von p-p38/p38-MAPK.....	90
4.6 Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstests	94
4.6.1 TGF- β Quantikine ELISA Kit.....	94
4.6.2 IGF-1 Quantikine ELISA Kit.....	95
4.6.3 FGFb Quantikine ELISA Kit	97
5 Diskussion.....	98
5.1 Diskussion der Methoden	98
5.1.1 Zellkultur	98
5.1.2 Studienmodell.....	100
5.2 Diskussion der Ergebnisse	100
5.2.1 Deaktivierung von p-p38/p38-MAPK und p-ERK/ERK-1/2.....	100
5.2.2 Connexin-43 und β -Aktin.....	103
5.2.3 Spiegelanalysen der Wachstumsfaktoren TGF- β , FGFb und IGF-1.....	106
5.2.4 Schlagfrequenzen	109
5.3 Apoptose als mögliche Ursache des anti-hypertrophen Effekts?.....	110
5.4 Vermutetes Adipozytokinprofil.....	111
5.5 Limitationen.....	113
5.6 Ausblick.....	113
6. Zusammenfassung der Arbeit	115

7 Literaturverzeichnis	118
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	130
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	133
Lebenslauf	134
Danksagung.....	135

Bibliografische Beschreibung

Gerhardt, Florian

Einfluss einer 24-stündigen Behandlung von neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten mit einem Adipozyten-konditionierten Medium auf Hypertrophie-assoziierte Signalwege und Zellproteine

Universität Leipzig, Dissertation

135 Seiten, 95 Literatur, 32 Abbildungen, 23 Tabellen

Referat:

Die weltweite Zunahme der Prävalenz von Übergewicht und Adipositas und den damit verbundenen medizinischen und sozioökonomischen Herausforderungen stellt eine der wesentlichen Herausforderungen der modernen medizinischen Versorgung dar. Im Mittelpunkt stehen dabei insbesondere die Auswirkungen von Übergewicht und Adipositas auf das kardiovaskuläre System und den damit verbundenen funktionellen und strukturellen Veränderungen der kardiovaskulären Funktion.

Als Mediatoren dieser funktionellen und strukturellen Veränderungen stehen dabei zunehmend Adipozytokine im Interesse wissenschaftlicher Arbeiten. Unter Adipozytokinen versteht man in diesem Zusammenhang einen Sammelbegriff für von Adipozyten und anderen Fettgewebszellen sezernierten autokrin-, endokrin- und parakrin wirkenden bioaktiven Molekülen. Insbesondere bei Übergewicht und Adipositas kommt es zu einer charakteristischen Veränderung im Sekretionsmuster dieser Adipozytokine. Die Wirkung einzelner Adipozytokine auf die kardiovaskuläre Funktion wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht, über die Wirkung ganzer Adipozytokinprofile ist bisher jedoch nur wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, welchen Einfluss eine 24-stündige Behandlung von neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten mit einem physiologischen Adipozytokin-Profil auf Hypertrophie-assoziierte Signalwege und Zellproteine hat.

Abkürzungsverzeichnis

AA/BIS	Acrylamid (AA)/N,N-Methylenbisacrylamid (BIS)
AdipoR	Adiponektinrezeptor
AKM	Adipozyten-konditioniertes Medium
AMPK	5'-AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BMI	<i>body mass index</i> , Körpermasseindex
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , bovines Serumalbumin
CR	Zytokinrezeptor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> , Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung
DPP-4	Dipeptidylpeptidase-4
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> , extrazellulär Signal-regulierte Kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
FGFb	<i>fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i> , Glucagon-ähnliches Peptid
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HS	<i>horse serum</i> , Pferdeserum
IGF-1	<i>Insuline-like growth factor 1</i> , insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i> , C-Jun N-terminale Kinase
KCL	Kaliumchlorid

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KKM	Kardiomyozyten-konditioniertes Medium
LEPR	Leptinrezeptor
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MKK	<i>MAPK-kinases</i> , MAPK-Kinase
MKKK	<i>MKK-kinases</i> , MKK-Kinase-Kinase
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i> , nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	PBS-Tween®20
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i> , Radio-Immunoprecipitation-Assay
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSTK	Rezeptor-Serin/Threoninkinase
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler
TBS	Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS-Tween®20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF-β	<i>transforming growth factor</i> , Transformierender Wachstumsfaktor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü. N.	über Nacht
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , Endothelwachstumsfaktor
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsbehörde

1 Einleitung

1.1 Übergewicht und Adipositas

Übergewicht und Adipositas werden von der Weltgesundheitsbehörde (WHO, World Health Organization) mit Hilfe des Körpermasseindex (BMI, body mass index) klassifiziert, wobei Übergewicht im Allgemeinen eine zu hohe Körpermasse in Relation zur Körpergröße darstellt. Für die Berechnung und Klassifikation des BMI's wird der Quotient aus Körpergewicht in Kilogramm und Körpergröße in Meter zum Quadrat herangezogen. Wie in Tabelle 1 ersichtlich, ergeben sich sechs Klassifikationsgrade. Übergewicht besteht demnach ab einem BMI ≥ 25 und Adipositas ab einem BMI ≥ 30 (James, 2004).

Tabelle 1: BMI Klassifikationen

Gewichtsklassifikation (Europa, USA)	BMI (kg/m ²)
Untergewicht	<18,5
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Übergewicht (Präadipositas)	25,0 – 29,9
Adipositas Grad I	30,0 – 34,9
Adipositas Grad II	35,0 – 39,9
Adipositas Grad III	40 oder mehr

Nach den neusten Erkenntnissen der WHO stellen Übergewicht und Adipositas zwei der größten und bedeutendsten medizinischen und sozioökonomischen Herausforderungen der modernen Zeit dar. Die „International Obesity Task Force“ (IOTF, International Obesity Task Force) berichtete, dass weltweit rund 1,1 Milliarden Menschen übergewichtig sind, wovon wiederum rund 312 Millionen adipös sind (James, Rigby, & Leach, 2004). Zudem wird davon ausgegangen, dass Übergewicht mittlerweile zwischen 30-70% und Adipositas zwischen 10-30% aller Erwachsenen in europäischen Ländern betrifft. Zahlen aus den Vereinigten Staaten von Amerika belegen, dass dort bereits 60% der Erwachsenen und 30% der Kinder übergewichtig sind (Nakamura, Fuster, & Walsh, 2014).

Innerhalb der letzten 30 Jahre hat sich die weltweite Prävalenz von Übergewicht nahezu verdoppelt und der mittlere BMI stieg weltweit um 0,4 kg/m² bei Männern und um 0,5 kg/m² bei Frauen pro Dekade an (Finucane et al., 2011). Auch die Zahl der übergewichtigen

Jugendlichen und Kinder stieg zwischen 1980 und 2008 kontinuierlich an, wobei mittlerweile davon ausgegangen werden kann, dass ungefähr 30% der amerikanischen und 22-25% der europäischen Schulkinder übergewichtig oder adipös sind (Bibiloni, Pons, & Tur, 2013).

1.1.1 Übergewicht und Adipositas als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen

Übergewicht und Adipositas stellen entscheidende und wesentliche Risikofaktoren für die Entstehung von Stoffwechselstörungen, Krebs, muskuloskeletalen-, sowie kardiovaskulären Erkrankungen dar (Stevens et al., 2012).

Bezüglich der kardiovaskulären Manifestationen stehen strukturelle und funktionelle Veränderungen, wie insbesondere arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit, kardiale Dysfunktion, Herzversagen und Herzhypertrophie im Vordergrund (Murphy et al., 2006). Darüber hinaus konnte in mehreren Studien ein direkter Zusammenhang zwischen Übergewicht und der Entstehung von Herzrhythmusstörungen, dabei insbesondere von Vorhofflimmern, beobachtet werden (Frost, Hune, & Vestergaard, 2005; Rothe et al., 2014).

Die Gründe für das erhöhte kardiovaskuläre Risiko Übergewichtiger sind in erster Linie mit den direkten Folgen des Übergewichts auf den Organismus zu erklären. Dazu zählen unter anderem Glukosestoffwechselstörungen und Fettstoffwechselstörungen. Hinzu kommen oft allgemein gültige Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Nikotinabusus, arterielle Hypertonie und hohes Lebensalter.

Adipositas, Dyslipidämie, arterielle Hypertonie und Glukosestoffwechselstörungen charakterisieren dabei in wesentlichen Teilen das so genannte metabolische Syndrom, eines der grundlegenden Risikofaktoren für das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen (Grundy, 2015).

Hinzu kommen aber auch neuere Erkenntnisse über das viszerale Fettgewebe in der Funktion eines eigenständigen endokrinen Organs, welches eine Vielzahl biologisch aktiver Mediatoren sezerniert und typischen pathologischen Veränderung bei Übergewicht unterliegt (siehe Kapitel 1.2.3).

Zusammengefasst spielen alle oben genannten Faktoren eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Arteriosklerose und den damit einhergehenden kardiovaskulären Erkrankungen (Lau, Dhillon, Yan, Szmitko, & Verma, 2005; Van Gaal, Mertens, & De Block, 2006).

1.1.2 „Obesity Paradox“

Die direkten Zusammenhänge zwischen Übergewicht und Adipositas als wesentliche Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen konnten in mehreren großen Studien eindeutig belegt werden (siehe Kapitel 1.1.1).

Entgegen aller als gegensächlich beschriebenen Effekte von Übergewicht und Adipositas auf die kardiovaskuläre Funktion, haben in letzter Zeit jedoch auch mehrere Studien einen positiven Effekt von Übergewicht und insbesondere Adipositas Grad I und II auf die auf Mortalität und Morbidität von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben (S. H. Kim, Després, & Koh, 2015; Sharma et al., 2015).

Die Tatsache, dass die kardiovaskuläre Mortalität von adipösen Patienten geringer ist, als die Mortalität Normalgewichtiger, wird als „Obesity Paradox“ bezeichnet. Im Gegenzug konnte auch beschrieben werden, dass Untergewicht, Gebrechlichkeit und Kachexie die Mortalität und Morbidität vieler Krankheiten erhöht, inklusive die der kardiovaskulären Ereignisse (Lavie et al., 2015). Gleichwohl ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei Übergewichtigen und Adipösen signifikant höher.

Die genauen Hintergründe des „Obesity Paradox“ sind bis jetzt nicht ausreichend verstanden und aufgeklärt. Gesichert scheint aber, dass die metabolische Reserve Übergewichtiger höher ist, als die von Untergewichtigen. Somit sind Übergewichtige besser in katabolen Stoffwechsellagen geschützt, wie sie in kardiovaskulären Erkrankungen häufig vorkommen (Lavie et al., 2015).

1.2 Fettgewebe und Adipozytokine

Fettgewebe wird anhand seiner makroskopischen bzw. histologischen Erscheinung in zwei Formen unterschieden. Dabei grenzt man univakuoläres weißes Fettgewebe von plurivakuolärem braunem Fettgewebe ab.

Weißes Fettgewebe kommt im menschlichen Körper in Form von viszeralem und subkutanem Fettgewebe vor. Viszerales Fettgewebe wird überwiegend durch das omentale Fettgewebedepot repräsentiert, wohingegen subkutanes Fettgewebe überwiegend durch abdominale, gluteale und femorale Fettgewebedepots repräsentiert wird (White & Tchoukalova, 2014).

Mehrere Studien belegen, dass vermehrtes viszerales und Oberkörper-betontes subkutanes Fettgewebe positiv mit dem Auftreten metabolischer Komplikationen korreliert. Gluteale und femorale Fettgewebedepots sind demnach mit einem geringeren metabolischen Risiko assoziiert (White & Tchoukalova, 2014).

Die wesentlichen Lokalisationen von braunem Fettgewebe beim Erwachsenen und Säugling befinden sich zervikal/axillär, perirenal/adrenal, entlang der großen Blutgefäße und entlang der Trachea. Beim Neugeborenen finden sich zusätzliche Fettgewebedepots interskapulär (Betz & Enerbäck, 2015; Enerbäck, 2010).

1.2.1 Aufbau und Funktion von Fettgewebe

Das Verständnis über die Funktion und Komplexität des viszeralen Fettgewebes hat sich innerhalb der letzten Jahre stark gewandelt. Das Fettgewebe in der Funktion eines endokrinen Organs steht zunehmend im Fokus aktueller Forschungen (Blüher, 2014; Kershaw & Flier, 2014; Klötting & Blüher, 2014).

Fettgewebe besteht im Wesentlichen aus zwei Fraktionen, den Adipozyten und einer gut vaskularisierten Stroma-Fraktion, in der Präadipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Leukozyten, und Kollagenmatrix zu differenzieren sind (Hajer, van Haeften, & Visseren, 2008).

Die Hauptaufgaben des Fettgewebes bestehen in der Speicherung von Triglyzeriden in anabolen und deren Freisetzung in katabolen Stoffwechsellagen, Thermoregulation und der mechanischen Organprotektion. Weißes Fettgewebe dient insbesondere als Energiespeicher, Druckpolster und Wärmeisolator. Braunes Fettgewebe dient überwiegend der Wärmeproduktion bei Neugeborenen und Säuglingen. Darüber hinaus kann man Fettgewebe nach aktuellen Erkenntnissen auch als ein sehr komplexes und hochaktives endokrines Organ bezeichnen.

Diese Bezeichnung beruht vorwiegend auf der Tatsache, dass Fettgewebe eine Vielzahl an lokal und systemisch wirkenden bioaktiven Signalmolekülen sezerniert (siehe Kapitel 1.2.2) (Kershaw & Flier, 2014).

1.2.2 Adipozytokine und deren Funktionen

Adipozyten, Präadipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Leukozyten sezernieren eine Vielzahl autokrin, endokrin und parakrin wirkender bioaktiver Substanzen – die so genannten Adipozytokine. Tabelle 2 gibt einen Überblick über eine kleine Auswahl an Adipozytokinen und deren Funktion wieder.

Das gesamte Sekretom des Fettgewebes konnte bislang noch nicht vollständig entschlüsselt werden, es scheint aber so zu sein, dass mehr als 600 verschiedene Adipozytokine identifiziert werden können (Fasshauer & Blüher, 2015). Die zahlreichen Funktionen der Adipozytokine als Regulatoren zentraler und metabolischer Prozesse innerhalb des menschlichen Organismus sind ebenfalls sehr vielfältig und verschieden.

Wie in Abbildung 1 aufgeführt, regulieren sie zum Beispiel Appetit, Sättigung, Insulinsensitivität, Energieumsatz, Entzündung und Endothelfunktion (Blüher, 2014).

Tabelle 2: Übersicht über die Funktionen einiger Adipozytokine (modifiziert nach Dhein, 2014; Fasshauer & Blüher, 2015).

Adipozytokin	Wirkung/Funktion
Adiponektin	Insulinsensitivität \uparrow , anti-inflammatorisch (IL-6 \downarrow , TNF- α \downarrow), anti-atherogen, anti-diabetogen
Apelin	Insulinsekretion \downarrow
Chemerin	Adipozytendifferenzierung, pro-inflammatorisch
DPP-4	Degradierung von GIP und GLP-1
IL-6, IL-1 β	pro-inflammatorisch
Leptin	Regulation von Hunger/Appetit, IL-6 \uparrow , TNF- α , VEGF \uparrow
Omentin	anti-inflammatorisch, Insulinsensitivität \uparrow
Resistin	Insulinsensitivität \downarrow , Inflammation, TNF- α \uparrow
TGF- β	Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose
TNF- α	pro-inflammatorisch
Vaspin	Insulinsensitivität \uparrow , Leptin \downarrow , Resistin \downarrow , Adiponektin \downarrow
VEGF	Angiogenese
Visfatin	IL-6 \uparrow , IL-8 \uparrow

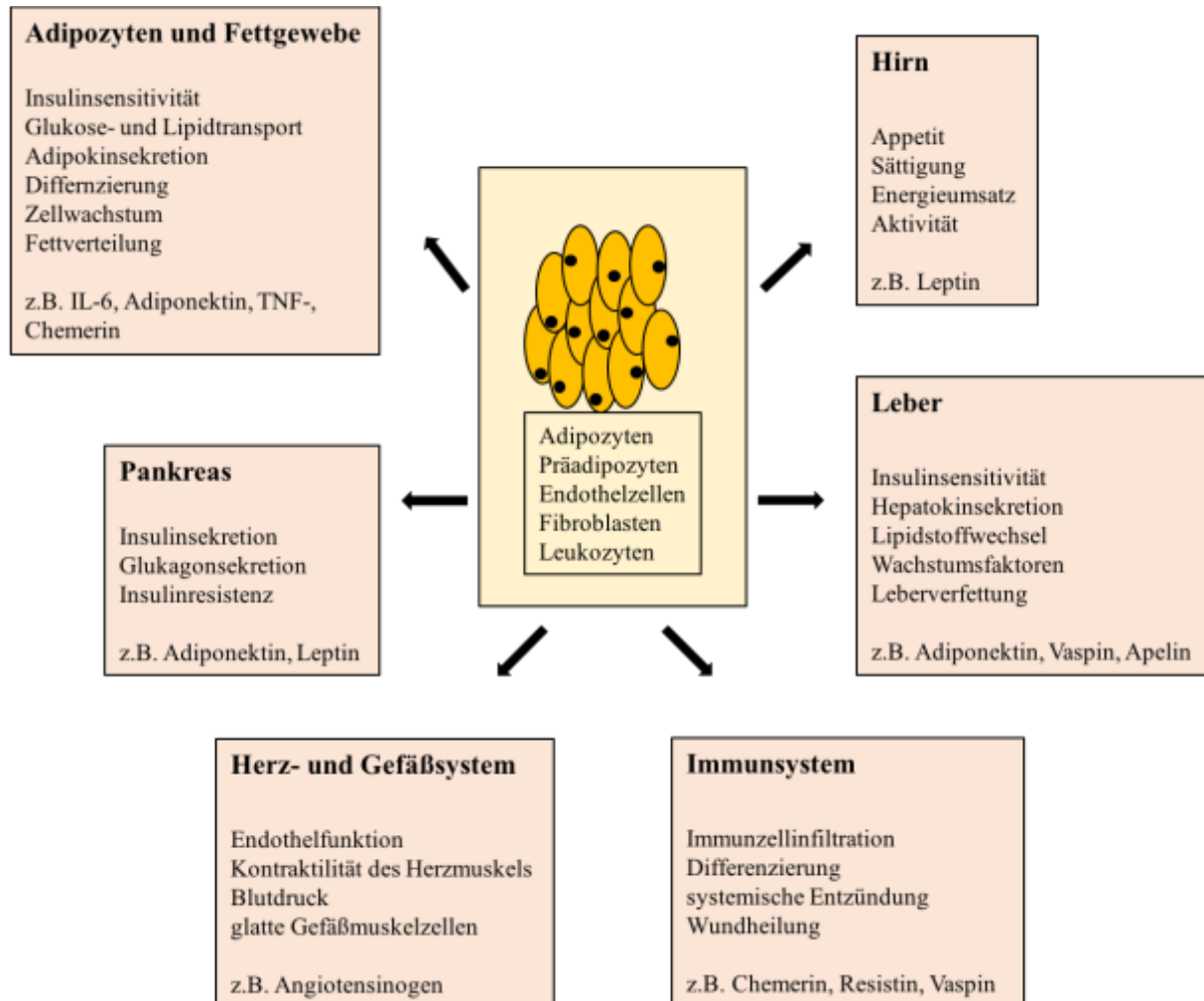


Abbildung 1: Adipozytokine und deren Funktionen auf den menschlichen Organismus (modifiziert nach Blüher, 2014).

1.2.3 Veränderung im Fettgewebe bei Übergewicht

Fettgewebe Übergewichtiger unterscheidet sich zum einen morphologisch und zum anderen auch im Sekretom vom Fettgewebe Normalgewichtiger. Morphologisch führt die dauerhaft positive Kalorienbalance bei Übergewichtigen zu einer Hypertrophie und Hyperplasie der Adipozyten und führt damit zu einer Vergrößerung und Vermehrung viszeraler Fettgewebedepots (Arner et al., 2010).

Diese Veränderungen führen wiederum zu einer gestörten Biologie der Adipozyten. Dieser Umstand wird auch als „adipozytäre-Dysfunktion“ bezeichnet und wird auf zellulärer Ebene unter anderem durch verminderte Insulinresistenz, Hypoxie, gesteigerten intrazellulären Stress, gesteigerte Autophagie, Apoptose und Inflammation charakterisiert. Gemeinsames Endstück dieser pathologischen Veränderungen ist ein verschobenes Sekretom der Adipozyten und anderen Fettgewebszellen, hin zu schädlichen und nachteilig wirkenden Funktionen der Adipozytokine auf den menschlichen Organismus und das kardiovaskuläre System (Klötting & Blüher, 2014).

Hinzukommt, dass sich die zelluläre Zusammensetzung des Fettgewebes ändert. Die Infiltration des Gewebes durch Makrophagen, Lymphozyten und anderen Leukozyten steht dabei im Vordergrund (Nakamura et al., 2014).

Das Sekretom verschiebt sich auf der einen Seite stark zugunsten pro-inflammatorischer (z.B. IL-6, IL-1 β , TNF- α), pro-atherogener (z.B. Cathepsin, Leptin) und pro-diabetogener (z.B. Leptin, Chemerin) Adipozytokine, auf der anderen Seite ist die Sekretion anti-inflammatorisch wirkender Adipozytokine stark vermindert (Klötting & Blüher, 2014; Northcott, Yeganeh, Taylor, Zahradka, & Wigle, 2012).

Nach neueren Erkenntnissen wird Übergewicht sogar als eine chronisch inflammatorische Erkrankung bezeichnet (Molica, Morel, Kwak, Rohner-Jeanrenaud, & Steffens, 2015). Diese geringgradig chronische Inflammation wird auch als „Adiposopathie“ beschrieben (Van De Voorde, Pauwels, Boydens, & Decaluwé, 2013).

Es wird vermutet, dass eben diese chronische Entzündung und verschobene endokrine bzw. parakrine Funktion des Fettgewebes eine der wesentlichen Schlüsselstellen in der Vernetzung von Übergewicht und kardiovaskulären Erkrankungen darstellt (Van De Voorde et al., 2013). Darüber hinaus könnten die Veränderung im Sekretom zu der Entstehung von weiteren metabolischen, entzündlichen und malignen Erkrankungen beitragen (Fasshauer & Blüher, 2015).

In Zusammenschau mit Tabelle 2 und Abbildung 2 wird deutlich, wie sich das Sekretom in dysfunktionalem Fettgewebe zugunsten der oben genannten Adipozytokine und deren unmittelbar damit verbundenen Funktionen verschiebt.

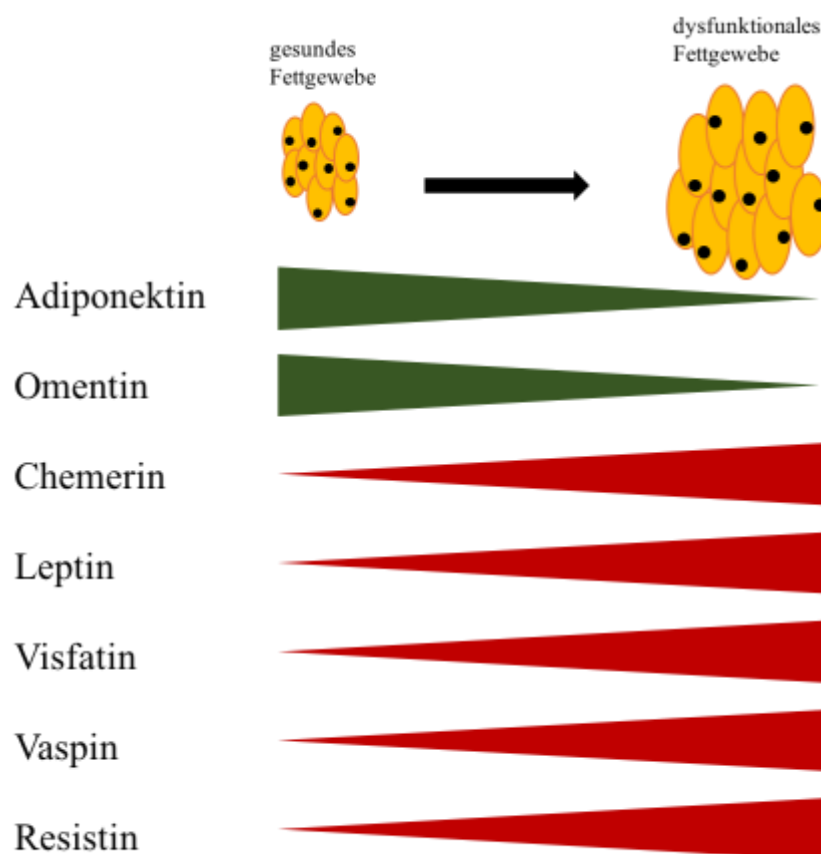


Abbildung 2: Veränderungen in der Adipozytokinsekretion in gesundem und dysfunktionalem Fettgewebe (modifiziert nach Northcott et al., 2012).

1.2.4 Adipozytokine als Mediatoren kardiovaskulärer Erkrankungen

Adipozytokine in ihrer Gesamtheit wirken auf eine Vielzahl biologischer Prozesse in unterschiedlichen Zelltypen, die zur Regulation des kardiovaskulären Systems beitragen (Northcott et al., 2012). Die Summe der damit verbundenen strukturellen und funktionellen Veränderungen ist es, die für die Wirkung auf das kardiovaskuläre System verantwortlich ist (Van De Voorde et al., 2013).

Adipozytokine können dabei sehr gegenteilige Wirkungen in Bezug auf arterielle Hypertonie, Endothelfunktion, Arteriosklerose, Inflammation und Kardiomyozytenfunktion haben. Einige Adipozytokine, wie zum Beispiel Adiponektin und Omentin können protektiv wirken und die physiologische kardiale Funktion bewahren. Andere Adipozytokine wiederum, wie Leptin oder Resistin, wirken dagegen eher nachteilig auf das kardiovaskuläre System und können zur Entstehung von Arteriosklerose, Endotheldysfunktion und Inflammation beitragen (Mattu & Randeva, 2013).

Aufgrund der bei Übergewicht beschriebenen „Adiposopathie“ überwiegen bei Übergewichtigen jedoch die nachteiligen Wirkungen mit den daraus folgenden Konsequenzen.

Adipozytokine als Mediatoren kardiovaskulärer Erkrankungen können somit strukturelle und funktionelle Veränderungen am Herzen direkt und indirekt beeinflussen. Sie können direkt durch die Einflüsse auf kardiale Hypertrophie, Apoptose, Fibrose und metabolischen Veränderungen, sowie indirekt durch ihre systemischen Wirkungen auf Insulinsensitivität, Dyslipidämie, Hypertonie und die bereits erwähnte chronische Inflammation Einfluss nehmen (Abel, Litwin, & Sweeny, 2008).

Abbildung 3 gibt einen zusammenfassenden Überblick einiger wichtiger Adipozytokine und deren Wirkungen auf das kardiovaskuläre System wieder.

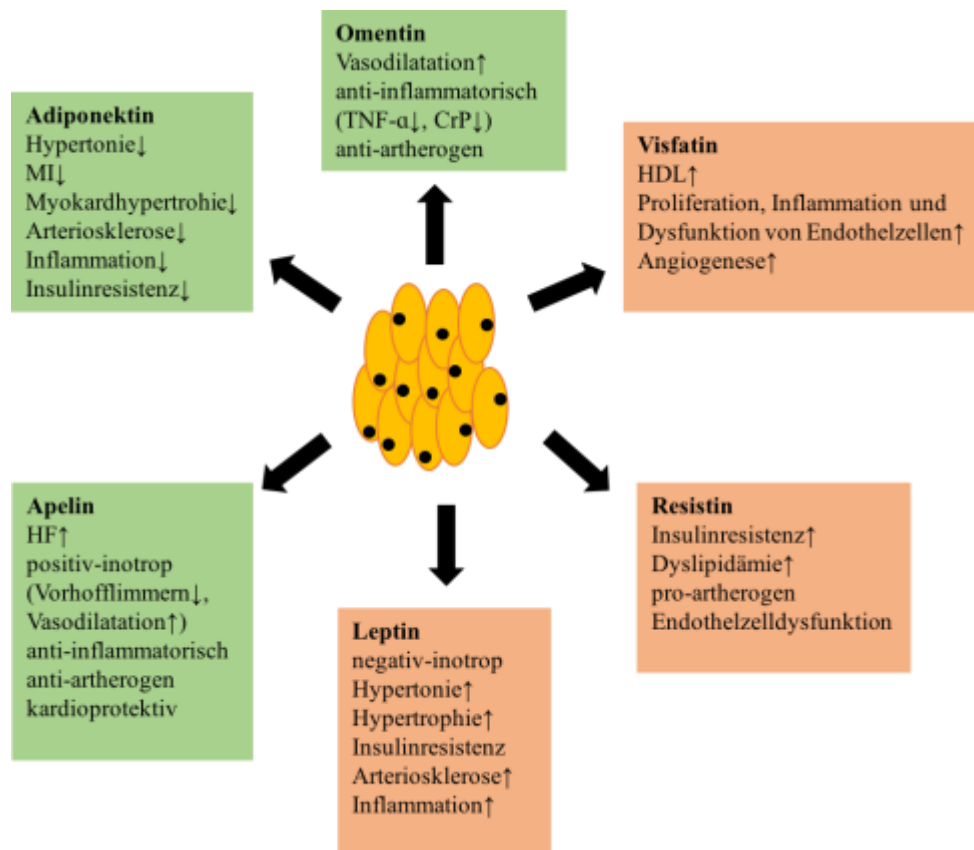


Abbildung 3: Adipozytokine und deren Wirkung auf das kardiovaskuläre System (modifiziert nach Mattu & Randeve, 2013).
HF- Herzfrequenz, MI- Myokardinfarkt, TNF-α- Tumornekrosefaktor-α, CrP- C-reaktives Protein, HDL- high-density Lipoprotein

1.2.5 Adipozytokine und deren Wirkung auf Kardiomyozyten

In den letzten Jahren besteht zudem zunehmendes Interesse bezüglich der endokrinen Effekte von Adipozytokinen auf das Herzmuskelgewebe und den damit verbundenen strukturellen und funktionellen Veränderungen (Abel et al., 2008; Northcott et al., 2012).

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, sind bislang Hunderte verschiedene Adipozytokine bekannt. Am besten und ausführlichsten sind allerdings die Wirkungen von Adiponektin und Leptin in der Literatur beschrieben.

In Tabelle 3 werden exemplarisch die Wirkungen dieser beiden Adipozytokine auf Kardiomyozyten gegenübergestellt. Es stellt sich heraus, dass die Wirkungen von Adiponektin eher als kardio-protectiv einzuschätzen ist, wohingegen die Wirkungen von Leptin als schädigend beschrieben werden (Gualillo, González-Juanatey, & Lago, 2007; Northcott et al., 2012; Van De Voorde et al., 2013).

Tabelle 3: Wirkungen von Adiponektin und Leptin auf Kardiomyozyten (modifiziert nach Dhein, 2014; Northcott et al., 2012). ROS- reaktive Sauerstoffspezies, EZM- Extrazellulärmatrix

Adiponektin	Glukose-„uptake“↑, Glukoseoxidation↑, Glykogensynthese↑, Fettsäure-„uptake“↑, Fettsäureoxidation↑, ROS-Produktion↓, Apoptose↓, Stress-induzierte Hypertrophie↓
Leptin	Hypertrophie↑, Remodeling der EZM↑, Kontraktilität↓

Adiponektin vermittelt die oben genannten Funktionen vorrangig über die beiden Adiponektinrezeptoren *AdipoR1* und *AdipoR2*. Glukose-„uptake“ und Glukoseoxidation bzw. Fettsäure-„uptake“ und Fettsäureoxidation, sowie die verminderte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies werden über die Aktivierung einer AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK, AMP-activated protein kinase) realisiert. Zudem ist die aktivierte AMPK an der Regulation der zellulären Hypertrophie beteiligt. Dies wird durch eine Inhibition der mit Hypertrophie assoziierten Signalkaskaden ERK-1/2 umgesetzt (siehe Abb. 4, Kapitel 1.3.1 und 1.3.1.1) (Northcott et al., 2012).

Die Wirkungen von Leptin werden überwiegend durch den Leptinrezeptor *LEPR*, ein Zytokinrezeptor, vermittelt. Die nachgeschaltete Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen hat für Regulation des kardialen Remodelings und der kardialen Hypertrophie eine entscheidende Bedeutung (siehe Abb. 4 und Kapitel 1.3).

Die negativen Auswirkungen auf die kardiale Kontraktilität wird über die Beeinflussung der Kalziumkonzentrationen und der Dichte des Natrium/Kalzium Austauschers *INCX* reguliert (Northcott et al., 2012).

1.3 Signaltransduktion in kardialer Hypertrophie

Zelluläre Hypertrophie ist eine wesentliche Reaktion des Herzens auf eine hämodynamische Überlastung, sei es Druck- oder Volumenüberlastung. Diese Überlastung kann Ausdruck von arterieller Hypertonie, Myokardinfarkt, koronarer Herzkrankheit, Herzklappenerkrankungen oder Kardiomyopathien sein (Glennon, Sugden, & Poole-Wilson, 1995).

Darüber hinaus spielen eine Vielzahl weiterer nicht-hämodynamischer Faktoren eine Rolle in der Pathogenese kardialer Hypertrophie. Hierzu zählen unter anderem bestimmte Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β , IGF-1 und FGFb), Hormone (z.B. Katecholamine) und andere Signalmoleküle (Hefti, Harder, Eppenberger, & Schaub, 1997; Heineke & Molkentin, 2006).

Einige dieser Stimuli induzieren zunächst eine Phase kompensierter kardialer Hypertrophie, in der Kardiomyozyten in Länge und Breite wachsen und so eine ausreichende Pumpfunktion des Herzens gewährleisten. Nichtsdestotrotz geht diese Phase der Kompensation in eine Phase der Dekompensation über, in der langanhaltende kardiale Hypertrophie für Herzversagen, Herzrhythmusstörungen und plötzlichen Herztod prädisponiert (Heineke & Molkentin, 2006).

Adulte Kardiomyozyten sind terminal ausdifferenzierte Zellen, die sich während der Perinatalzeit dem normalen Zellzyklus entziehen und somit nicht mehr proliferationsfähig sind (Clerk & Sugden, 2004; Hefti et al., 1997). Sie reagieren auf die oben genannten Faktoren nicht durch Hyperplasie, einer Vergrößerung durch Erhöhung der Zellzahl, sondern vorrangig mit zellulärer Hypertrophie, einer Größenzunahme infolge einer gesteigerten zellulären Proteinbiosynthese (Muslin, 2008).

Dabei sind zwei Signaltransduktionssysteme in der Pathogenese kardialer Hypertrophie von vorrangiger Bedeutung. Zum einen die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK, mitogen-activated protein kinases), eine Gruppe von zellulären Enzymen, die Proteinphosphorylierungen katalysieren und das Calcineurin/Calmodulin System, welches Proteindephosphorylierungen katalysiert (Sugden, 2001).

Für die Aktivierung dieser Signalkaskaden sind eine Vielzahl von extrazellulären und intrazellulären Signalmolekülen und Rezeptoren verantwortlich. Zu den bekanntesten und wichtigsten Rezeptoren zählen unter anderem G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Enzym-gekoppelte Rezeptoren, wie Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Rezeptor-Serin/Threoninkinasen und spezifische Ligandenrezeptoren (Hefti et al., 1997). Neben den bereits erwähnten Signalmolekülen spielt ebenso zellulärer Stress eine wichtige Rolle. Dieser Stress kann mechanischer-, osmotischer- oder metabolischer Stress sein, sowie Ausdruck entzündlicher Zytokine (Mutlak & Kehat, 2015; Strnisková, Barancík, & Ravingerowá, 2002).

Die Aktivierung dieser Signaltransduktionssysteme löst eine sehr komplexe intrazelluläre Signalkaskade aus, an der eine Vielzahl spezifischer Zellproteine beteiligt sind. Gemeinsame Endstrecke dieser beiden Systeme ist die Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren. Diese sind für die Regulation der Genexpression Hypertrophie-assoziiierter Gene verantwortlich.

1.3.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs)

MAPK Signalkaskaden spielen nicht nur eine entscheidende Rolle in der Pathogenese kardialer Hypertrophie, sondern regulieren ebenso eine Vielzahl anderer biologischer Prozesse. Innerhalb der MAPKs werden 3 Subfamilien unterschieden. Hierzu zählen die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERK, extracellular signal-regulated kinases), die p38-MAPKs und die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK, c-Jun N-terminal kinases) (Bogoyevitch & Court, 2004; Sugden, 2001).

MAPKs sind Signalkaskaden, die auf einer Sequenz sich sukzessive und gegenseitig phosphorylierender Kinasen beruhen. Die Aktivierung der MAPKs erfolgt „upstream“ über eine dreistufige Proteinphosphorylierung. Dabei werden MAPKs von MAPK-Kinasen (MKKs, MAPK kinases) phosphoryliert, die wiederum von MAPK-Kinase-Kinasen (MKKK, MKK kinases) phosphoryliert werden (Garrington & Johnson, 1999).

Eine Stimulus-spezifische MAPK Antwort kann durch die Aktivierung verschiedener MKKK-MKK-MAPK Module realisiert werden. Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, zellulärer Stress, osmotischer Stress oder DNA Schäden aktivieren dabei für den jeweiligen Stimulus charakteristische Module (Garrington & Johnson, 1999).

Am Ende dieser Signalkaskade werden die MAPKs ebenfalls phosphoryliert und dadurch in ihren biologisch aktiven Zustand überführt. Aktiviert phosphorylieren sie „downstream“ wiederum eine Vielzahl an Proteinen. Hierunter zählen unter anderem spezifische Transkriptionsfaktoren und viele weitere zelluläre Proteine.

Abbildung 4 gibt einen stark vereinfachten Überblick über die Signalkaskaden der MAPKs wieder.

1.3.1.1 Extrazellulär Signal-regulierte Kinasen (ERKs)

Bislang wurden 8 verschiedene ERKs beschrieben, wobei ERK-1 (p44-MAPK) und ERK-2 (p42-MAPK) die Prototypen Mitogen-aktivierter Proteinkinasen sind. Ihre Aktivierung ist stark mit Zellproliferation, Zellhypertrophie, Zelldifferenzierung und Zellüberleben assoziiert (Bogoyevitch & Court, 2004).

Eine Vielzahl von aktivierenden Stimuli konnte bislang identifiziert werden. Zu den etabliertesten und potentesten Stimuli gehören Agonisten an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Insbesondere Endothelin-I, Angiotensin-II und α -adrenerge Agonisten, wie zum Beispiel Phenylephrin, müssen dabei genannt werden (Clerk & Sugden, 2004).

In der Aktivierungskaskade von ERK-1/2 phosphorylieren MKKKs der Ras-Proteinfamilie (z.B. c-RAF, A-RAf, B-RAF) „downstream“ die MKKs MKK1 und MKK2. MKK1 und MKK2 aktivieren wiederum „downstream“ ERK-1/2 durch Phosphorylierung (Clerk & Sugden, 2004).

1.3.1.2 P38-MAPKs und c-Jun N-terminale Kinasen

P38-MAPKs und JNKs werden auch Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK, stress-activated protein kinases) genannt (Liang & Molkentin, 2003). Ihre Aktivierung wird heute zunehmend mit pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1 β) und zellulären Stressfaktoren assoziiert. Aktiviert wirken sie auf Angiogenese, Inflammation, Proliferation und Apoptose (Mutlak & Kehat, 2015).

P38-MAPKs werden „upstream“ direkt durch die MKKs MKK3 und MKK6 phosphoryliert, wohingegen JNKs „upstream“ durch MKK4 und MKK7 phosphoryliert werden (Heineke & Molkentin, 2006).

1.3.2 Calcineurin/Calmodulin

Die Proteinphosphatase Calcineurin wird durch den Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration aktiviert. Die Aktivierung wird dabei durch das Calcium-bindende Protein Calmodulin vermittelt (Sugden, 2001).

Im biologisch aktiven Zustand dephosphoryliert Calcineurin „downstream“ den nuclear factor of activated T-cells (NFAT, nuclear factor of activated T-cells). NFAT transloziert daraufhin in den Nucleus und reguliert als Transkriptionsfaktor die Genexpression von mit Hypertrophie assoziierten Genen in Kardiomyozyten (Heineke & Molkentin, 2006; Wilkins & Molkentin, 2004).

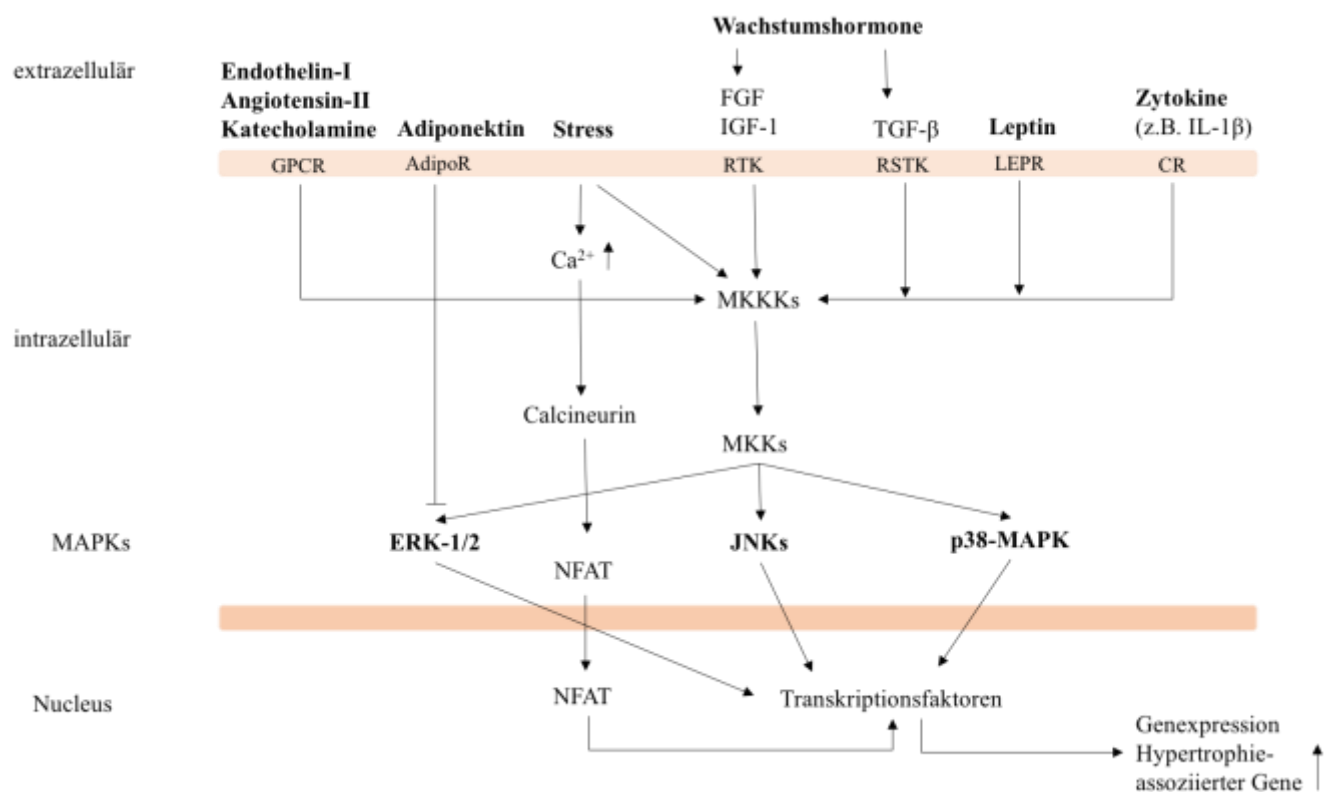


Abbildung 4: Vereinfachter Überblick der Signaltransduktionssysteme MAPKs und Calcineurin/Calmodulin (modifiziert nach Garrington & Johnson, 1999; Hefti et al., 1997). GPCR- G-Protein-gekoppelter Rezeptor, AdipoR- Adiponektinrezeptor, LEPR- Leptinrezeptor, RTK- Rezeptor-Tyrosinkinase, RSTK- Rezeptor-Serin/Threoninkinase, CR- Zytokinrezeptor, FGF- fibroblast growth factor, IGF-1- insulin-like growth factor, TGF- β - transforming growth factor

1.4 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob die 24-stündige Behandlung von neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten mit einem Adipozyten-konditionierten Medium einen Einfluss auf Hypertrophie-assoziierte Signalwege und Zellproteine hat. Zudem sollte untersucht werden, ob sich die Behandlung auf die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten auswirkt. Als Kontrolle sollten dabei Kardiomyozyten dienen, die in gleicher Weise mit einem Kardiomyozyten-konditionierten Medium behandelt wurden.

Zur Klärung dieser Fragen sollten Western-Blot-, ELISA-, und mikroskopische Untersuchungen herangezogen werden.

Folgende Fragen standen dabei im Fokus:

- 1) Lassen sich nach der Behandlung Veränderungen in den Phosphorylierungsratios von p-ERK/ERK-1/2 und p-p38/p38-MAPK nachweisen?
- 2) Lassen sich nach der Behandlung Veränderungen in der Proteinexpression der bei Hypertrophie typischerweise verstärkt exprimierten Zellproteine Connexin-43 und β -Aktin feststellen?
- 3) Hat die Behandlung einen Einfluss auf die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten?
- 4) Finden sich Veränderungen in den Spiegeln von Hypertrophie-assoziierten Wachstumsfaktoren in den jeweiligen konditionierten Medien?

2 Materialien

2.1 Allgemeine Geräte

Tabelle 4: Verwendete allgemeine Geräte

Gerät	Bezeichnung, Typ	Firma	Stadt, Land
Dampfsterilisator	VARIOKLAV®	HP Medizintechnik GmbH	Oberschleißheim, Deutschland
Eismaschine	ZBE 30-10	ZIEGRA Eismaschinen GmbH	Isernhagen, Deutschland
elektrische Pipettierhilfe	pipetus®standard	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co AG	Eberstadt, Deutschland
Feinwaage	CP225D	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Fotoapparat	Power Shot G5	Canon Europe Ltd	Middlesex, England
Gefrierschrank	Gefrierschrank	Robert Bosch GmbH	Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Kühlschrank	Kühlschrank	Robert Bosch GmbH	Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Magnetrührer	Model l-71	A. Hartenstein GmbH	Würzburg, Deutschland
pH Meter	pH Level 1 InoLab	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH	Weilheim, Deutschland
Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Rüttelplatte	Titer Plate Shaker	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Spectrophotometer	FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH	Ortenburg, Deutschland
Tischzentrifuge	5417R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling, Deutschland
Umkehrmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss Jena GmbH	Jena, Deutschland
Vortex Mixer	VM 300	Gemmy Industrial Corp.	Taipei, Taiwan
Waage	FA-3100-2	Faust Laborbedarf AG	Schaffhausen, Schweiz
Zentrifuge	Heraeus Biofuge Stratos	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA

2.1.1 Geräte für die Zellkultur

Tabelle 5: Verwendete Geräte für Zellkultur

Geräte für Zellkultur	Bezeichnung, Typ	Firma	Stadt, Land
Brutschrank	Heraeus FUNCTION Line Brutschrank	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Schüttelwasserbad	GFL Schüttelwasserbad 1083	Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel, Deutschland
Sterilwerkbank	HERAsafe Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA

2.1.2 Geräte für die biochemischen Analysen

Tabelle 6: Verwendete Geräte für die biochemischen Analysen

Geräte für SDS-Page und Western-Blot	Bezeichnung/Typ	Firma	Stadt, Land
Scanner	Expression 1100XL	EPSON Deutschland GmbH	Meerbusch, Deutschland
SDS-Page Apparatur	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Stromquelle	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Thermo-Cycler	MJ mini™ Personal	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Ultraschllbad	Sonorex Super RK 102H	Bandelin electronic	Berlin, Deutschland
Western-Blot Apparatur	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland

2.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Tabelle 7: Verwendete allgemeine Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel	Bezeichnung, Typ	Firma	Stadt, Land
Autoklavierband	SteriClin 811509	VP- Group	Feuchtwangen, Deutschland
Deckgläschen	Deckgläser 15 mm	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf Quality™ 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling, Deutschland
Objektträger	Menzel-Gläser-SUPERFROST® PLUS Objektträger	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Pipetten	Eppendorf Research®	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Wesseling, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten	TPP®Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	TTP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Spritzen	BD Plastipak™ Spritzen	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Spritzenfilter	Spritzenfilter 0,22 µm	TTP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Timer	KT188	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Untersuchungshandschuhe	Nitril NextGen®	Rösner-Mautby Meditrade GmbH	Kiefersfelden, Deutschland
Wiegeschalen	41x41x8 mm, 89x89x22 mm	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	91015, 91050	TTP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz

2.2.1 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel für die Zellkultur

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel für die Zellkultur

Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel für Zellkultur	Bezeichnung, Typ	Firma	Stadt, Land
Bottle Top Filter	Nalgene®FastCap™ bottle- top filter unit	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda Königshofen, Deutschland
OP-Besteck	große Schere, gebogene Schere, Pinzette	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland
Skalpell	Surgical Disposable Scalpels	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland
Zellkulturflasche	90075, 90076	TTP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	93040, 93150	TTP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatte	92006, 92012	TTP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP® Zellschaber	TTP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Zellsieb	Porengröße 500 µm	TTP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz

2.2.2 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel für die biochemischen Analysen

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel für die biochemischen Analysen

Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel für SDS-Page und Western-Blot	Bezeichnung/Typ	Firma	Stadt, Land
Filterpapier	Whatman® gel blotting paper	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Gelkammer- Apparatur	Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Stand with Clamp Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Glasplatten	Short Plates, Spacer Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Mikroliterspritze	Model 710 N SYR	Hamilton Laboratory Products	Reno, USA
Probenkämme	Mini-PROTEAN® Comb	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
PVDF-Membran	Roti®-PVDF	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Röntgenfilm	Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare	München, Deutschland
Röntgenfilm	T-MAT G/RA Film	Carestream Health Deutschland GmbH	Stuttgart, Deutschland
Röntgenkassette	Typ G/GR	Rego X-Ray GmbH	Stuttgart, Deutschland
Waschschalen		Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland

2.3 Allgemeine Chemikalien

Tabelle 10: Verwendete allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Typ, Bezeichnung	Firma	Stadt, Land
2-Propanol	$\geq 99,95\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	Milli-Q [®] Academic System	Millipore GmbH	Schwalbach, Deutschland
Ethanol	vergällt, $\geq 99,8\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Formaldehydlösung	Säurefrei, $\geq 37\%$, für die Zellkultur	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Pufferan [®] , $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Methanol	$\geq 99\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
NaCl	$\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
NaOH	$> 99\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, rauchend	37%	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
SDS	Ultra pure, $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Tris	Pufferan [®] , $\geq 99,9\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Tris-hydrochlorid	Pufferan [®] , $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland

2.3.1 Biochemikalien für die Zellkultur

Tabelle 11: Verwendete Biochemikalien für die Zellkultur

Biochemikalien für Zellkultur	Typ, Bezeichnung	Firma	Stadt, Land
DPBS	LonzaBioWhittaker™ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with Calcium and Magnesium	Lonza Group Ltd.	Basel, Schweiz
Fetales Kälberserum	Gibco® Fetal Bovine Serum	Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Gelatine	Gelatin from porcine skin, Type A	Sigma- Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Glucose	α -D(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Hank's Balanced Salts	HBSS, ohne Phenolrot und Natriumbicarbonat	Sigma- Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Kollagenase I	Collagenase, CLSI (365 U/mg)	BIOCHROM AG	Berlin, Deutschland
Kollagenase II	Collagenase, CLSII (295 U/mg)	BIOCHROM AG	Berlin, Deutschland
Medium 199	Medium 199 with Earle's BSS, with L-glutamine, HEPES and 2.2 g/L NaHCO ₃	Lonza Group Ltd.	Basel, Schweiz
Penicillin/Streptomycin	Penicillin/Streptomycin (10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin)	Sigma- Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Pferdeserum	Gibco® Horse Serum	Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Rinderalbumin	BSA, Bovine Serum Albumin	Sigma- Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Gibco® Trypan Blue Solution 0,4%	Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland

2.3.2 Medikamente

Tabelle 12: Verwendete Medikamente für die Narkose der Tiere

Wirkstoff	Präparat	Firma	Stadt, Land
Fentanyl	Fentanyl®-Janssen	Janssen CILAG GmbH	Neuss, Deutschland
Midazolamhydrochlorid	Dormicum®	Ratiopharm GmbH	Ulm, Deutschland
Medetomidinhydrochlorid	Domitor®	Janssen Pharmaceutica	Beerse, Belgien
Heparin	Heparin-Natrium	Ratiopharm GmbH	Ulm, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	Rompun® 2%	Bayer Health care GmbH	Leverkusen, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Ursotamin®	Serumwerk Bernburg AG	Bernburg, Deutschland
Atropin	Atropinsulfat	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland

2.3.3 Chemikalien für die biochemischen Analysen

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien für die biochemischen Analysen

Chemikalien für SDS-Page und Western Blot	Typ, Bezeichnung	Firma	Stadt, Land
2-Mercaptoethanol	99%	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis Solution	30%	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
APS	≥ 98%	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Na-Salz	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
DTT	≥ 99%	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
ECL-Lösung	SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
EDTA		Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Entwickler	Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Essigsäure	≥ 99,9%, reinst	Carl Roth GmbH und Co AG	Karlsruhe, Deutschland

Fetales Kälberserum	Gibco® Fetal Bovine Serum	Life Technologies GmbH	Darmstadt, Deutschland
Fixierer	Carestream® Kodak® autoradiography GBX fixer/replenisher	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Glycerol	99%	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Natriumfluorid	99%	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Natriumorthovanadat	≥ 90%	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Natruimdesoxycholsäure		Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Nonidet-P40		AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
PMSF	≥ 99%	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe, Deutschland
Ponceau	2R	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Protease & Phosphatase Inhibitor	Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific, Pierce Protein Research	Rockford, USA
Protein Marker V	peqGOLD Protein-Marker V	PEQLAB Biotechnology GmbH	Erlangen, Deutschland
TEMED	99%	Carl Roth GmbH und Co AG	Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	P1379, viscous liquid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland

2.3.3.1 Antikörper für die biochemischen Analysen

Tabelle 14: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die biochemischen Analysen

Protein	Typ, Bezeichnung	Firma	Stadt, Land
p-ERK-1/2	Maus-anti-p-ERK-1/2 (monoklonal) Sc-7383	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Texas, USA
ERK-1/2	Kaninchen-anti-ERK-1/2 (polyklonal) Sc-153	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Texas, USA

p-p38-MAPK	Kaninchen-anti-p-p38 (Tyr 182) (polyklonal) Sc-7975-R	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Texas, USA
p38-MAPK	Kaninchen-anti-p38 (polyklonal) Sc-728	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Texas, USA
β -Aktin	Maus-anti- β -Actin (monoklonal) ab6276	abcam®	Cambridge, USA
Connexin-43	Kaninchen-anti-Connexin-43 (polyklonal) C 6219	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
GAPDH	Maus-anti-Kaninchen GAPDH (monoklonal) #5G4	HyTest Ltd.	Turku, Finnland
anti-Maus	Kaninchen-anti-Maus-IgG-HRP (polyklonal) A 9044	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
anti-Kaninchen	Maus-anti-Kaninchen-IgG-HRP (monoklonal) A 1949	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
anti-Kaninchen	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP (polyklonal) A 9169	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland

2.3.4 Chemikalien für die Histologie und Immunhistologie

Tabelle 15: Chemikalien für die Histologie und Immunhistologie

Chemikalien für Histologie, Immunhistologie	Typ, Bezeichnung	Firma	Stadt, Land
Oil-Red-O	O0625	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Methylenblau	15943	Certistain	Darmstadt, Deutschland
Triton™ X-100	9002-93-1	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Rinderalbumin	BSA, Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
DPBS	LonzaBioWhittaker™ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with Calcium and Magnesium	Lonza Group Ltd.	Basel, Schweiz
DAPI	DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Fluoreszenz-Eindeckmedium	S3023	Dako Deutschland GmbH	Hamburg, Deutschland
Dako Cytomation Diluent	S3022	Dako	Glostrup, Dänemark
Immersionsöl	518F	Carl Zeiss Jena GmbH	Jena, Deutschland

2.3.4.1 Antikörper für die immunhistologischen Untersuchungen

Tabelle 16: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistologie

Protein	Typ, Bezeichnung	Firma	Stadt, Land
Connexin-43	Kaninchen-anti-Connexin-43 (polyklonal) C6219	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland
Troponin-I	Maus-anti-Troponin-I (monoklonal) ab19615	abcam®	Cambridge, USA

Zellkernfärbung	DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
anti-Kaninchen	Alexa Fluor® 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG A11008	Invitrogen™	Waltham, USA
anti-Maus	Alexa Fluor® 555 Ziege-anti-Maus IgG A21422	Invitrogen™	Waltham, USA

2.4 Tiere

Für die Isolation neonataler Kardiomyozyten wurden Ratten der Linie Sprague-Dawley, mit den Tötungsanzeigen T17/13, aus dem Medizinisch- Experimentellen- Zentrum in Leipzig bezogen. Die Tiere waren zwischen 24 und höchstens 48 Stunden alt.

Für die Isolation der Adipozyten wurde adulte männliche Ratten, mit den Tötungsanzeigen T16/13 verwendet, die ebenfalls vom Medizinisch- Experimentellen- Zentrum in Leipzig bezogen wurden.

2.5 Zellkulturmedien

Stopp-Medium für Kardiomyozyten

Medium 199	465 ml
5% FKS	25 ml
2% Penicillin / Streptomycin	10 ml

Medium 1. Tag für Kardiomyozyten

Medium 199	415 ml
10% HS	50 ml
5% FKS	25 ml
2% Penicillin / Streptomycin	10 ml

Folgemedium für Kardiomyozyten

Medium 199	435 ml
10% HS	50 ml
1% FKS	5 ml
2% Penicillin / Streptomycin	10 ml

Adipozytenkulturmedium

Medium 199	445 ml
10% FKS	50 ml
1% Penicillin / Streptomycin	5 ml
5 mM Glukose	495 mg

2.6 Lösungen und Puffer

2.6.1 Lösungen und Puffer für die Zellkultur

10x PBS

NaCl	120 mM
KCl	2,68 mM
Na ₂ HPO ₄	8,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,42 mM
ad ddH ₂ O, pH = 7,4	

1x PBS

10x PBS	10%
ad ddH ₂ O	

20 mM PBS-Glukose-Lösung

Glukose	20 mM
ad PBS	

Kollagenase-I-Verdaulösung

1x PBS	100 ml
BSA	1,5%
Glukose	5 mM
Kollagenase-I	0,25%

Kollagenase-II-Verdaulösung

PBS-Glukose-Lösung	50 ml
BSA	1%
Kollagenase-II	1000 U/neonatale Ratte

1%ige Gelatine

Gelatine	1%
ad Aqua dest.	

2.6.2 Lösungen und Puffer für die Histologie und Immunhistologie

1x PBS

10x PBS	10%
ad ddH ₂ O	

1%ige BSA-Lösung

BSA	1%
ad 1x PBS	

2%ige BSA-Lösung

BSA	2%
ad 1x PBS	

0,25% Triton-X100-PBS-Lösung

Triton-X-100	0,25%
ad 1x PBS	

60%iges Isopropanol

Isopropanol	60%
ad Aqua dest.	

Oil-Red-O-Stammlösung

Oil-Red-O	0,5%
ad Isopropanol	

Oil-Red-O-Arbeitslösung

Oil-Red-O-Stammlösung	3 Teile
ad Aqua dest.	2 Teile

Methylenblau

Methylenblau	0,1%
ad Aqua dest.	

7%ige Formaldehydlösung für Oil-Red-O-Färbung

Formaldehydlösung	19%
ad 1x PBS	

4%ige Formaldehydlösung für Immunfluoreszenzfärbung

Formaldehydlösung	11%
ad 1x PBS	

2.6.3 Lösungen und Puffer für die biochemischen Analysen

2.6.3.1 Protease-Inhibitoren

200 mM Natriumorthovanadat

Für die Aktivierung wurden 3,68 g Natrium-Orthovanadat in 100 ml Aqua dest. angesetzt und bis zum vollständigen Auflösen des Pulvers gerührt. Die entstandene Lösung wurde anschließend durch Titration mit HCl bzw. NaOH auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Indikator dafür ist eine Gelbfärbung der Lösung bei pH = 10. Die Lösung wurde nun gekocht, bis sie wieder farblos wurde und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Dieses Procedere wurde drei- bis fünfmal wiederholt, bis die Lösung einen stabilen pH-Wert von 10 hatte und bei Raumtemperatur farblos war.

500 mM Natriumfluorid

Natriumfluorid	500 mM
ad Aqua dest.	

1 mM PMSF

PMSF	1 mM
ad 99% EtOH	

2.6.3.2 RIPA-Stocklösung und RIPA-Lysepuffer

1 M TRIS

TRIS	1 M
ad Aqua dest., pH = 7,4	

400 mM EDTA

EDTA	400 mM
ad Aqua dest., pH = 7	

5 M NaCl

NaCl	5 M
ad Aqua dest.	

Zusammensetzung RIPA-Stocklösung

1 M TRIS	50 mM
Nonidet-P40	1%
Natriumdesoxycholsäure	0,25%
5 M NaCl	150 mM
400 mM EDTA	1 mM
ad Aqua dest., pH = 7,4	

Zusammensetzung RIPA-Lysepuffer

RIPA Stocklösung	
200 mM Natriumorthovanadat	1%
500 mM Natriumfluorid	1%
1 mM PMSF	1%
500 mM EDTA-Solution	1%
Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail	1%

Tabelle 17: Pipettierschema für RIPA-Lysepuffer

Anzahl der Proben		
Zusammensetzung	5	10
RIPA-Stocklösung	475 µl	950 µl
200 mM Natriumorthovanadat	5 µl	10 µl
500 mM Natriumfluorid	5 µl	10 µl
1 mM PMSF	5 µl	10 µl
500 mM EDTA- Solution	5 µl	10 µl
Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail	5 µl	10 µl

2.6.3.3 Lösungen und Puffer für die SDS-Page

Trenngelpuffer (lower-buffer)

TRIS	1,5 M
EDTA	8 mM
SDS	13 mM
ad Aqua dest., pH = 8,8	

Sammelgelpuffer (upper-buffer)

TRIS	500 mM
EDTA	8 mM
SDS	13 mM
ad Aqua dest., pH = 6,8	

10% APS

APS	10%
ad ddH ₂ O	

10x SDS-Laufpuffer

TRIS	500 mM
Glycin	3,8 M
SDS	35 mM
ad ddH ₂ O	

1x SDS-Laufpuffer

10x SDS-Laufpuffer	10%
ad ddH ₂ O	

6x Auftragspuffer nach Lämmli

Glycerol	50%
DTT	600 mM
SDS	10%
TRIS	1,5 M
Bromphenolblau	0,05%
ad ddH ₂ O	

2.6.3.4 Lösungen und Puffer für den Western-Blot

10x Transferpuffer

TRIS	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	7 mM
ad ddH ₂ O	

1x Transferpuffer

10x Transferpuffer	10%
Methanol	20%
ad ddH ₂ O	

0,5%ige Ponceau-Färbelösung

Ponceau	0,5%
Essigsäure	5%
ad ddH ₂ O	

5x TBS

TRIS	250 mM
NaCl	2,5 M
ad ddH ₂ O, pH = 7,4	

1x TBS-Tween®20

5x TBS	10%
Tween®20	0,1%
ad ddH ₂ O	

1%ige BSA/TBS-T-Lösung

BSA	1%
ad 1x TBS-Tween®20	

2%ige BSA/TBS-T-Lösung

BSA	2%
ad 1x TBS-Tween®20	

Stripping-Solution

Glycin	120 mM
2-Mercaptoethanol	100 mM
SDS	7 mM
ad ddH ₂ O, pH≤2,9	

Entwickler-Lösung

Entwickler	20%
ad ddH ₂ O	

Fixierer-Lösung

Fixierer	20%
ad ddH ₂ O	

2.7 Kommerzielle Kits

Tabelle 18: Verwendete Kommerzielle Kits

Kit	Bezeichnung, Typ	Firma	Stadt, Land
Mouse/Rat IGF-I Quantikine ELISA Kit	MG100	R&D Systems, Inc.	Minneapolis, USA
Mouse/Rat FGF basic Quantikine ELISA Kit	MFB00	R&D Systems, Inc.	Minneapolis, USA
Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-beta 1 Quantikine ELISA Kit	MB100B	R&D Systems, Inc.	Minneapolis, USA
BCA-Kit	Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Chemilumineszenz Substrat	SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Protease Inhibitoren	Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA

2.8 Computersoftware

Tabelle 19: Verwendete Computersoftware

Verwendung	Bezeichnung, Typ	Firma	Stadt, Land
Allgemeine Berechnungen	Excel, Microsoft Office 2010	Microsoft Deutschland GmbH	Unterschleißheim, Deutschland
Bestimmung der Proteinkonzentration	MARS Data Analysis Software, Version 2.10R2	BMG LABTECH GmbH	Ortenberg, Deutschland
Densitometrische Auswertung der Western Blots	Quantity One® 1-D Analysis Software 4.4.0	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Digitale Bildverarbeitung	AxioVision 4.8.2	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Erstellung von Abbildungen	Power Point Microsoft Office 2010	Microsoft Deutschland GmbH	Unterschleißheim, Deutschland
Statistische Auswertung	SigmaPlot 12.5	Systat Software GmbH	Erkrath, Deutschland

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Präparation von ventrikulären Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten

Für die Kultivierung neonataler ventrikulärer Kardiomyozyten wurden bis höchstens zwei Tage alte Tiere der Linie Sprague Dawley aus dem Medizinisch-Experimentellen Zentrum in Leipzig bezogen. Alle Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Leipzig genehmigt.

Nachdem die Tiere durch Dekapitation getötet wurden, wurde eine Thorakotomie durchgeführt und die Herzen mittels einer gebogenen Schere herauspräpariert. Die so gewonnenen Herzen wurden in einer auf Eis gelagerten Zellkulturschale gesammelt, in die PBS-Glukose-Lösung (PBS, phosphate buffered saline) vorgelegt wurde. Im folgenden Arbeitsschritt wurden die sichtbaren Gefäße und Atrien von den Herzen entfernt und die so gewonnen Ventrikel in eine zweite Zellkulturschale überführt, die ebenfalls auf Eis lagerte und mit PBS-Glukose-Lösung gefüllt war. Alle nun folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilwerkbank.

Nachdem 2/3 der PBS-Glukose-Lösung abgesaugt wurde, wurden die Ventrikel mit Hilfe einer gebogenen Schere im verbleibenden Volumen an PBS-Glukose-Lösung so zerkleinert, dass Gewebestücke mit einer Größe von 1 mm³ vorhanden waren. Nachfolgend wurden die Gewebestücke in 3 ml Kollagenase-II-Verdaulösung aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Schritt wurde mit 2 ml Kollagenase-II-Verdaulösung wiederholt, um alle beim ersten Schritt in der Zellkulturschale zurückgebliebenen Gewebestücke vollständig aufzunehmen. Das Verdaulösung-Gewebegemisch wurde nachfolgend für eine Minute unter ständigen Schüttelbewegungen bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und der Gewebeverdau somit eingeleitet. Um den übermäßigen Verdau des Gewebes zu verhindern, wurde der Überstand nach Ablauf der Inkubationszeit und Sedimentation aller Gewebestücken unter der Sterilwerkbank abgenommen und 1:1 mit Stopp-Medium versetzt. Die Aktivität der Kollagenase wurde dadurch gehemmt und der weitere Gewebeverdau gestoppt. Das im Zentrifugenröhrchen verbliebene Gewebepellet wurde daraufhin in 5 ml frischer Kollagenase-II-Verdaulösung resuspendiert. Um eine möglichst schonende Isolation der Kardiomyozyten zu gewährleisten, wurden die folgenden

Inkubationszeiten kontinuierlich um eine Minute gesteigert, bis maximal sechs Minuten erreicht waren. Dieses Procedere wurde so lange beibehalten, bis die angesetzten 50 ml Kollagenase-II-Verdaulösung aufgebraucht waren.

Die sich nun im Stopp-Medium befindlichen Zellen wurden daraufhin für 15 Minuten bei 700 U/min pelletiert. Das Stopp-Medium wurde anschließend abgesaugt und das entstandene Pellet in 12 ml Medium 1. Tag resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension, bestehend aus Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, wurde im nächsten Arbeitsschritt in eine 75 cm² große Zellkulturflasche überführt und für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert (preplating). Während dieser Inkubationszeit adhärten die zusätzlich isolierten Fibroblasten und Endothelzellen am Boden der Zellkulturflasche, während sich im Überstand überwiegend Kardiomyozyten sammelten. Die Zellsuspension wurde anschließend aus der Zellkulturflasche entnommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Zellsuspension bei 37 °C im Wasserbad gelagert.

Für die Bestimmung der Zellzahl und zur Differenzierung zwischen vitalen und letalen Zellen diente eine 1:2 Verdünnung eines von der Zellsuspension abgenommenen Aliquotes und Trypanblau. Unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer wurden nun ausschließlich ungefärbte und somit vitale Zellen unter dem inversen Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Zur Berechnung der Gesamtzahl vitaler Zellen wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Gesamtzahl/ml} = \text{Mittelwert Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für die weiteren Versuche wurden 9,2 cm² große Zellkulturschalen mit 1%iger Gelatine beschichtet und jeweils 500.000 Zellen pro Schale eingesät. Dabei wurde das jeweils für 500.000 Zellen benötigte Volumen an Zellsuspension mit Medium 1. Tag auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und eingesät.

Die Kultivierung im Brutschrank erfolgte bei 37 °C und 5%iger CO₂-Begasung. Um nicht adhärente und abgestorbene Zellen zu entfernen, wurden die Zellen nach 24 Stunden mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) gespült und anschließend mit 2 ml Folgemedium versetzt.

3.1.2 Präparation von Adipozyten aus dem Nebenhodenfettpolster der männlichen adulten Ratte

Für die Isolation und Anlage einer primären, adhärennten Adipozytenkultur wurden 250-350 Gramm schwere männliche Ratten der Linie Sprague Dawley, ebenfalls aus dem Medizinisch-Experimentellen Zentrum in Leipzig, bezogen. Alle Tiertötungen wurden im Voraus durch das Regierungspräsidium Leipzig genehmigt.

Die Ratten wurden von unserer Tierärztin, Frau Dr. Susann Ossmann, mittels Injektionsnarkose, bestehend aus Ketamin (100 mg/kg i.p.), Xylazine (5 mg/kg i.p.) und Atropin (0,1 mg/kg i.p.), narkotisiert. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und das Herz entnommen, wodurch der Tod des Tieres in tiefer Narkose eintrat. Nachdem auch der Bauchraum eröffnet wurde, wurde das Nebenhodenfettpolster aufgesucht und komplett entnommen. Zusätzlich wurde bei einigen Tieren, abhängig von der individuellen Konstitution, Fettgewebe aus dem Bauchraum herauspräpariert.

Die zuvor gewonnenen Herzen wurden als Kontrollgewebe für weitere biochemische Untersuchungen in unseren anderen Laborversuchen aufgehoben.

Das weitere Vorgehen erfolgte nach der Methode von Fernyhough (Fernyhough et al., 2004). Das gewonnene Fettgewebe wurde unmittelbar nach Entnahme in ein Zentrifugenröhrchen überführt, in welches 30 ml warme Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution vorgelegt wurde. Unter der Sterilwerkbank wurden danach sichtbare Blutgefäße entfernt und das Fettgewebe in einer Zellkulturschale mit geringem Volumen HBSS gesammelt. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Skalpell so zerkleinert, dass Gewebestücke mit einer Größe von 1 cm² entstanden. Diese wurden dann gleichmäßig auf vier vorbereitete, mit jeweils 25 ml 37 °C warmer Kollagenase-I-Verdauungslösung gefüllte, Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Die Zentrifugenröhrchen wurden nun eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und dabei alle fünf Minuten vorsichtig invertiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgte ein Filtrationsschritt, bei dem das Kollagenase-I-Gewebegemisch durch ein 500 µm großes Zellsieb filtriert und der Durchfluss in zwei neue Zentrifugenröhrchen gesammelt wurde. Der so gesammelte Durchfluss wurde dann bei 186 g für zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Kollagenase-I-Verdauungslösung vorsichtig abgesaugt, ohne die sich nun im gebildeten Überstand befindlichen Adipozyten mit zu entfernen. Daran anschließend erfolgten zwei Waschschrte, bei denen jeweils 25 ml warme HBSS in die Zentrifugenröhrchen gegeben wurden und sich dann, nach vorsichtiger Inversion, eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 186 g anschloss. Nach Abschluss der Waschschrte wurde die HBSS abgesaugt und der verbleibende Überstand rasch in

Adipozytenkulturmedium aufgenommen und auf vier 25 cm² große Zellkulturflaschen aufgeteilt. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen komplett mit Zellkulturmedium befüllt, fest verschlossen und mit dem Boden nach oben bei 37 °C und 5% CO₂-Begasung für fünf Tage im Brutschrank inkubiert. So konnte gewährleistet werden, dass die im Medium schwimmenden Adipozyten am Boden der Zellkulturflaschen adhären. Nach Ablauf der fünftägigen Inkubationszeit wurde das Medium komplett entfernt und durch 7 ml frisches Medium je Zellkulturflasche ersetzt. Die Zellkulturflaschen wurden nun wieder mit dem Boden nach unten inkubiert. Mediumwechsel erfolgte aller zwei Tage.

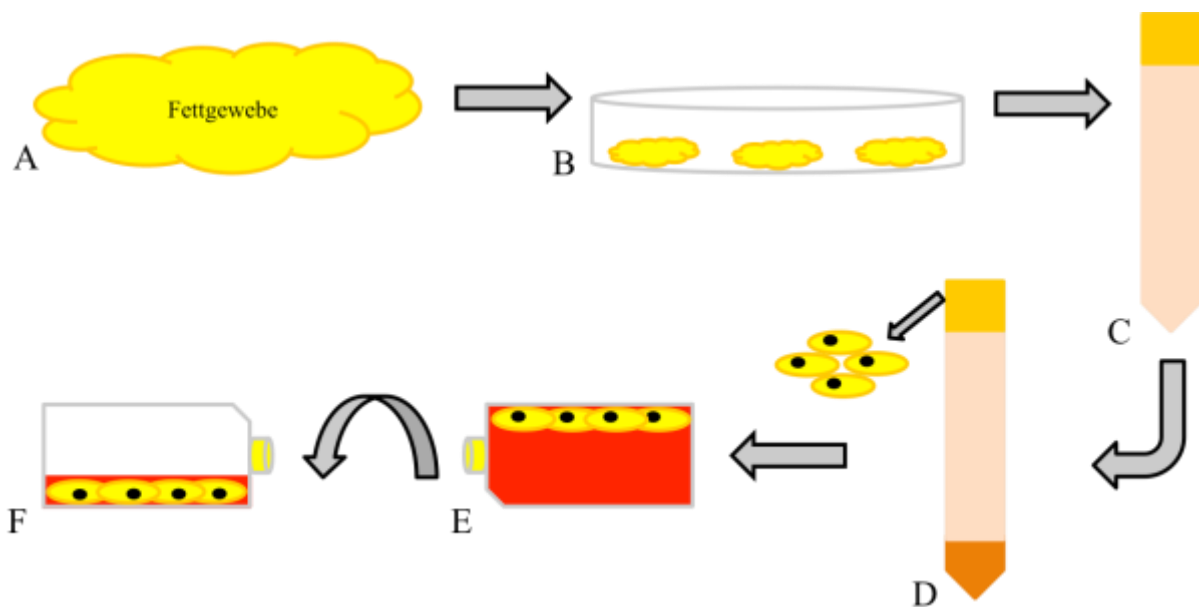


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Adipozytenisolation aus dem Nebenhodenfettpolster der Ratte. Das gewonnene Fettgewebe (A) wurde bis zur Isolation der Adipozyten in 37 °C warmer und steriler HBSS aufbewahrt. Unter der Sterilwerkbank werden anschließend sichtbare Blutgefäße entfernt und das Fettgewebe in 1 cm² große Gewebestücke zerkleinert (B). Anschließend werden jeweils fünf Gramm Gewebe auf die vorbereiteten 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 25 ml Kollagenase-I-Verdauung hinzupipettiert. Der enzymatische Gewebeverdaу geschah bei 37 °C im Wasserbad, wobei die Zentrifugenröhrchen alle fünf Minuten vorsichtig invertiert werden (C). Nachdem der Gewebeabbau beendet war, wurde das Kollagenase-I-Gewebegemisch durch ein Zellsieb der Porengröße 500 µm filtriert. Der Durchfluss wurde gesammelt und bei 186 g zehn Minuten zentrifugiert. Die Kollagenase-I-Verdauung und das entstandene Pellet, bestehend aus Präadipozyten, Fibroblasten und Erythrozyten, wurden anschließend vorsichtig abgenommen. Im Überstand befinden sich nun Adipozyten (D). Nach zwei Waschschritten mit HBSS und anschließender Zentrifugation für zehn Minuten bei 186 g wurden die Zellen rasch in Adipozyten-Zellkulturmedium aufgenommen und in 12,5 cm² Zellkulturflaschen überführt. Die Zellkulturflaschen wurden anschließend komplett mit Zellkulturmedium befüllt und für fünf Tage mit dem Boden nach oben bei 37 °C und 5%iger CO₂ Begasung inkubiert (E). Nach Ablauf der ersten Inkubationsphase wird das komplette Zellkulturmedium entfernt und durch 7 ml frisches Medium ersetzt. Die Zellkulturflaschen werden fortan wieder mit dem Boden nach unten inkubiert.

3.1.3 Gewinnung des Kardiomyozyten-konditionierten Mediums

Nach Abschluss der Präparation der neonatalen Kardiomyozyten wurden die vitalen Zellen mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und das entsprechende Volumen an Zellsuspension bestimmt, welches 500.000 Zellen entspricht. Dieses Volumen wurde entsprechend mit Medium 1. Tag auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und die Zellen wurden in die beschichteten Zellkulturschalen eingesät (siehe Kapitel 3.1.1).

Nach 24-stündiger Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Medium 1. Tag abgenommen und die Zellen mit jeweils 2 ml DPBS gewaschen, um Zelldetritus zu entfernen. Anschließend wurde jeweils 2 ml frisches Folgemedium zu den Zellen pipettiert.

Nach 48-stündiger Inkubationszeit wurde nun das Folgemedium abgenommen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellen wurden wieder mit DPBS gewaschen und 2 ml frisches Folgemedium wurde zu den Zellen gegeben.

Das so gewonnene Kardiomyozyten-konditionierte Medium (KKM, Kardiomyozyten-konditioniertes Medium) wurde daraufhin steril filtriert, in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei -20 °C eingefroren.

Um Unterschiede in der Beschaffenheit der gewonnenen Medien auszugleichen wurden die gesammelten Medien gepoolt. Dafür wurden die eingefrorenen Medien bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und unter der Sterilwerkbank erneut in ein steriles 100 ml Glasgefäß steril filtriert. Anschließend wurde das gepoolte Kardiomyozyten-konditionierte Medium in 15 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert und für die weiteren Versuche bei -20 °C eingefroren.

3.1.4 Gewinnung des Adipozyten-konditionierten Mediums

Nach der 5-tägigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde das komplette Adipozytenkulturmedium aus den Zellkulturflaschen unter der Sterilwerkbank abgenommen und verworfen. Anschließend wurden jeweils 7 ml frisches Adipozytenkulturmedium in die Zellkulturflaschen pipettiert.

Nach nun 2-tägiger Inkubationszeit im Brutschrank erfolgte ein frischer Mediumwechsel. Dabei wurde das jeweils abgenommene Medium in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und anschließend in ein neues Zentrifugenröhrchen steril filtriert. Das so gewonnene Adipozyten-konditionierte Medium (AKM, Adipozyten-konditioniertes Medium) wurden daraufhin bei -20 °C eingefroren. Dieses Prozedere wiederholte sich alle 2 Tage.

Nachdem genug konditioniertes Medium gesammelt wurde, wurden die Medien analog dem KKM gepoolt, um bestehende Unterschiede in der Beschaffenheit der Medien auszugleichen. Die einzelnen Medien wurden dafür im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend unter der Sterilwerkbank in ein autoklaviertes 100 ml Glasgefäß erneut steril filtriert. Danach wurde der Überstand in 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

3.1.5 Behandlung der ventrikulären Kardiomyozyten

Die Kardiomyozyten wurden wie beschrieben aus den neonatalen Ratten isoliert und anschließend zu je 500.000 Zellen in mit 1%iger Gelatine beschichtete 9,2 cm² große Zellkulturschalen eingesät. Als Kulturmedium diente dabei zunächst Medium 1. Tag. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit 2 ml DPBS gewaschen und anschließend für weitere 24 Stunden mit Folgemedium inkubiert. Nach Ablauf dieser zweiten Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit 2 ml DPBS gewaschen.

An diesen Waschschrift anschließend, wurden die Zellen mit den jeweiligen konditionierten Medien behandelt.

Dabei ergaben sich zwei voneinander unabhängige Behandlungsgruppen. Für jede Behandlungsgruppe wurden dabei jeweils dreimal ventrikuläre Kardiomyozyten isoliert und entsprechend für 24 Stunden behandelt (n = 3 für jede Behandlungsgruppe). Dabei wurde jeweils nur die Hälfte der angesetzten Zellkulturschalen behandelt. Die andere Hälfte wurde weiterhin mit Folgemedium behandelt und diente jeweils als Kontrolle. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellproteine isoliert (siehe Kapitel 3.3.1) und die biochemischen Western-Blot-Untersuchungen konnten durchgeführt werden (siehe Kapitel 3.3.5).

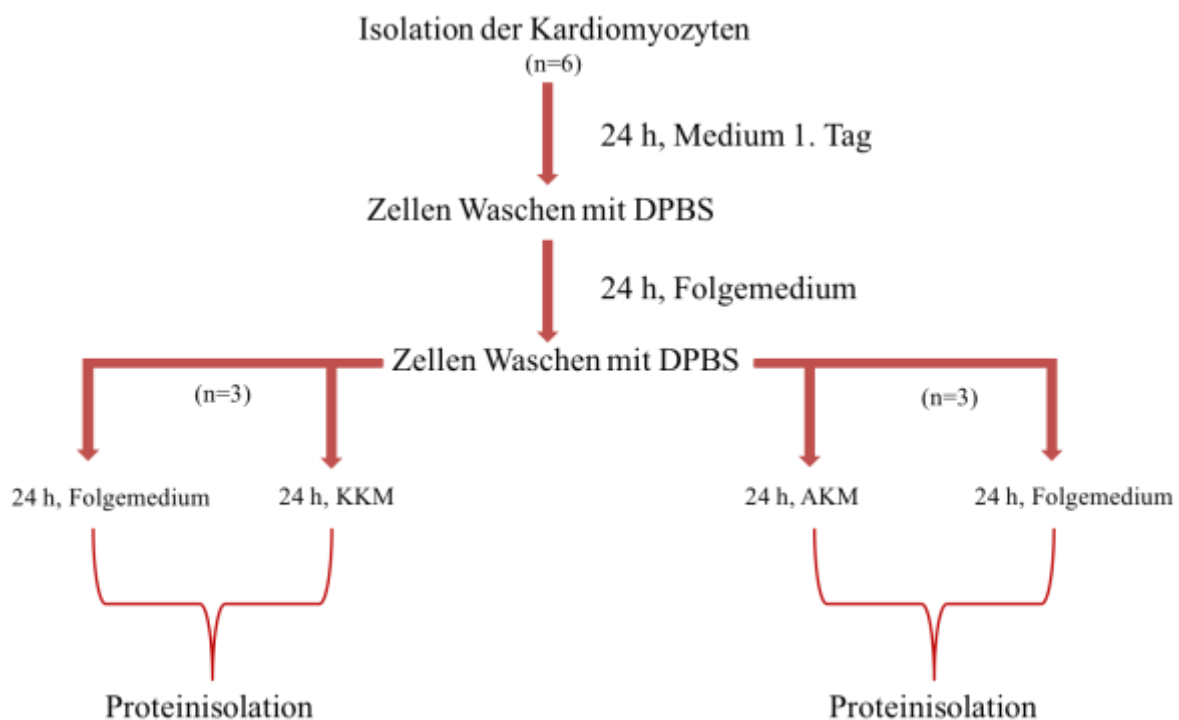


Abbildung 6: **Schematische Darstellung der beiden Behandlungsgruppen.** Dargestellt ist der Versuchsablauf für beide Behandlungsgruppen von der Isolation der Kardiomyozyten bis zur Proteinisolation.

3.1.6 Ermittlung der Schlagfrequenz von ventrikulären Kardiomyozyten

Um zu klären, ob die Behandlung mit den jeweiligen Zellkulturüberständen einen Einfluss auf die Vitalität und die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten hat, wurde die Schlagfrequenz jeweils vor und nach der 24-stündigen Behandlung ermittelt.

Um einer temperaturabhängigen Abnahme der Schlagfrequenz zu entgehen, wurden die Zellkulturschalen dafür jeweils einzeln aus dem Brutschrank genommen und die Schlagfrequenz wurde bestimmt. Dafür wurden jeweils 2 repräsentative Cluster kontrahierender Kardiomyozyten aufgesucht und die Frequenz über einen Zeitraum von 30 Sekunden gezählt. Von beiden Einzelwerten wurde anschließend der Mittelwert gebildet. Zur Umrechnung der Schlagfrequenz pro 30 Sekunden auf beats per minute (bpm, beats per minute) wurde anschließend der errechnete Mittelwert entsprechend mit dem Faktor zwei multipliziert.

Die Kontraktionsfähigkeit der Zellen unterliegt dabei vielen verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren. Exogene Faktoren sind zum Beispiel individuelle Präparationsbedingungen, Alter der Ratten, Alter des Zellkulturmediums und unterschiedliche Serumzusätze. Um möglichst identische Versuchsbedingungen zu gewährleisten wurde darauf geachtet, dass die Ratten nicht älter als 48 Stunden waren, Serumzusätze stets die gleiche Chargennummer aufwiesen und Zellkulturmedien nicht älter als sechs Wochen waren.

3.2 Histologie

3.2.1 Connexin-43- und Troponin-I- Immunfluoreszenz- Doppelfärbung

Ziel einer Immunfluoreszenzfärbung ist es, spezifische Proteine und Strukturen einer Zelle selektiv zu visualisieren. Ähnlich der Detektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran bei Western-Blot Untersuchungen gelingt dies durch spezifische Antigen- Antikörperbindungen. Fluoreszenzmarkierte Antikörper dienen dabei als Sekundärantikörper, die wiederum an Primärantikörper binden, die gegen das gewünschte Zielprotein gerichtet sind.

Um den Nachweis für Kardiomyozyten in der Zellkultur zu erbringen, wurden die Zellen mit der Connexin-43- und der kardiomyozytenspezifischen Troponin-I-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung angefärbt.

In kardialen Myozyten besteht der an der Kontraktion beteiligte Troponin-Komplex aus den drei Proteinen Troponin-T, Troponin-I und Troponin-C. Dabei bindet Troponin-T an Tropomyosin, Troponin-I reguliert die Interaktion von Aktin und Myosin und Troponin-C bindet Calciumionen, was zu einer Konformationsänderung führt und schließlich die Kontraktion durch Interaktion von Aktin und Myosin ermöglicht (Katrukha, 2013). Connexine hingegen gehören zu einer Gruppe von Transmembranproteinen, die maßgeblich für die Ausbildung von Gap-Junction Kanälen verantwortlich sind. Somit sind sie essentiell wichtig für die interzelluläre metabolische und elektrische Kommunikation von Kardiomyozyten (Kumar & Gilula, 1996).

Für die Färbung wurden die Zellen in 24-Well Zellkulturtestplatten kultiviert, die zusätzlich mit einem Deckgläschen bestückt wurden und mit 1%iger Gelatine beschichtet waren. Nachdem die Zellen konfluent zu einem Monolayer gewachsen waren, wurde in Vorbereitung auf die Färbung zunächst das gesamte Zellkulturmedium unter der Sterilwerkbank abgenommen und die Zellen wurden mit DPBS gespült. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Nachdem die Formaldehydlösung abgenommen wurde, wurden die Zellen dreimal für fünf Minuten mit 1x PBS gespült und die Reste der Formaldehydlösung entfernt. Um die Zellen zu permeabilisieren und somit für die folgenden Antikörper zugänglich zu machen, wurden sie anschließend für zehn Minuten mit 0,25%iger Triton-X100-PBS-Lösung bei Raumtemperatur behandelt. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Zellen mit 1x PBS für fünf Minuten wurde die Zellkulturtestplatte in eine feuchte Kammer überführt. Um freie und unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen für eine Stunde mit einer 2%igen BSA/PBS-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige BSA/PBS-Lösung wurde anschließend leicht

abgetropft und die Zellen wurden mit der Primärantikörperverdünnung behandelt. Primärantikörper, Verdünnungen und Inkubationszeiten sind der Tabelle zu entnehmen (siehe Tab. 18). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zunächst erneut dreimal für fünf Minuten mit 1x PBS gespült und dann mit der Sekundärantikörperverdünnung behandelt. Um eine Abschwächung des Lichtsignals der fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper zu verhindern, wurden diese Arbeiten im Dunklen ausgeführt. Sekundärantikörper, Verdünnungen und Inkubationszeiten sind ebenfalls der Tabelle zu entnehmen (siehe Tab. 18). Nach erneutem Waschen der Zellen mit 1x PBS erfolgte die Kerngegenfärbung. Dafür wurden die Zellen für eine Minute mit einer DAPI-Lösung behandelt (siehe Tab. 18). Abschließend wurden die Deckgläschen aus der Zellkulturtestplatte entnommen und mittels Mounting-Medium auf einem Objektträger eingedeckelt. Nach dem Trocknen der Objektträger konnten die Proben mikroskopiert werden.

Tabelle 20: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper. Dargestellt sind alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, sowie deren Firma, verwendete Verdünnungen und Inkubationszeiten.

Protein	Primärantikörper		Sekundärantikörper	
	Firma	Verdünnung und Inkubationszeit	Firma	Verdünnung und Inkubationszeit
Connexin-43	Kaninchen-anti-Connexin-43 (polyklonal) C6219 <i>Sigma-Aldrich® Chemie GmbH</i>	1:1000 in Dako Cytomation Diluent ü. N. bei 4 °C + 30 min bei RT	Alexa Fluor® 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG A11008 <i>Invitrogen™</i>	1:250 in Dako Cytomation Diluent 1 h bei RT
Troponin-I	Maus-anti-Troponin-I (monoklonal) ab19615 <i>abcam®</i>	1:250 in Dako Cytomation Diluent ü. N. bei 4 °C + 30 min bei RT	Alexa Fluor® 555 Ziege-anti-Maus IgG A21422 <i>Invitrogen™</i>	1:250 in Dako Cytomation Diluent 1 h bei RT
Zellkern	DAPI <i>Roche Diagnostics GmbH</i>	1:500 in 1x TBS eine min		

3.2.2 Oil-Red-O-Färbung

Um das Vorhandensein von Adipozyten in der Zellkultur zu bestätigen, erfolgte ein histologischer Nachweis von Lipiden mittels Oil-Red-O-Färbung. Dabei handelt es sich um eine einfache histologische Färbung, bei der der fettlösliche Azofarbstoff, Oil-Red-O, die Fettvakuolen der Adipozyten rot anfärbt.

In Vorbereitung für die Färbung wurde zuerst das Zellkulturmedium aus den Zellkulturflaschen abgenommen und die Zellen anschließend für 30 Minuten in 7%iger Formaldehydlösung fixiert. Nachdem die Fixierung abgeschlossen war, wurde die Formaldehydlösung wieder abgenommen und die Zellen zweimal mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurde für fünf Minuten 60%iges Isopropanol in die Zellkulturflasche gegeben. Nachdem auch das Isopropanol wieder abgenommen wurde, wurden die Zellen für zehn Minuten mit der Oil-Red-O-Arbeitslösung gefärbt. Damit nur die Fettvakuolen und nicht auch die umliegenden Zellkompartimente rot gefärbt wurden, wurde zum Differenzieren der Färbung erneut 60%iges Isopropanol zu den Zellen gegeben und die Entfärbung unter dem Mikroskop beobachtet. Die Zellen wurden anschließend erneut zweimal mit Aqua dest. gespült. Die Kerngegenfärbung erfolgte für fünf Minuten mit Methylenblau. Abschließend wurde das Methylenblau wieder abgenommen und die Zellen nochmals mit Aqua dest. gespült. Die Trocknung der gefärbten Zellen erfolgte an Luft bei Raumtemperatur.

3.3 Biochemische Untersuchungen

Um die Expression der untersuchten Proteine Connexin-43, β -Aktin, p-ERK/ERK-1/2 und p-p38/p38-MAPK in den beiden Behandlungsgruppen zu quantifizieren, wurden jeweils drei Western-Blot Untersuchungen für jedes Protein in den beiden Behandlungsgruppen durchgeführt. Dabei wurden bei jedem Western-Blot Proteinproben aufgetragen, die von der selben Präparation stammen. Pro Western-Blot wurden dabei drei bis vier Proteinproben von behandelten Zellen gegen die jeweils unbehandelten Zellen aufgetragen, die dabei jeweils als interne Kontrolle dienten.

3.3.1 Proteinextraktion

Alle der im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Nachdem das Zellkulturmedium aus den Zellkulturschalen abgesaugt wurde, wurden die einzelnen Zellkulturschalen zweimal mit gekühlter DPBS-Lösung gespült und so verbliebendes Zellkulturmedium von den Zellen gewaschen. Nachdem die DPBS-Lösung abgenommen wurde, wurden die Zellen mit eisgekühltem Radio-Immunoprecipitation-Assay-Lysepuffer (RIPA, Radio-Immunoprecipitation-Assay) versetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen anschließend von den Zellkulturschalen entfernt und die Zelllysate in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach zehnminütiger Ruhezeit auf dem Eis erfolgte ein 15-minütiger Zellaufschluss im Ultraschallbad. Um die Proteine von Zellwandbestandteilen und Zelltrümmern zu trennen, wurden die Zelllysate nach dem Zellaufschluss für fünf Minuten bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren war auf dem Boden der Eppendorf-Reaktionsgefäße ein Pellet zu erkennen, bestehend aus Zellwandbestandteilen und Zelltrümmern. Der Überstand, in dem sich nun die Proteine befanden, wurde abgenommen und in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Die so gewonnenen Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um zu gewährleisten, dass bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) möglichst gleiche Proteinmengen in die Auftragstaschen aufgetragen werden, wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels der BCA-Methode (BCA, Bicinchoninsäure) durchgeführt. Dafür wurde das *Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay-Kit* benutzt. Dieses Assay kombiniert zum einem die lange bekannte Biuret-Methode und zum anderen eine hoch sensitive und selektive kolorimetrische Detektion mittels Bicinchoninsäure. Dabei gehen zweitwertige-Kupfer-Ionen mit den Peptidbindungen der Proteine Chelat-Komplexe ein. Dies geschieht in alkalischer Lösung und resultiert in einem Farbumschlag der Lösung nach dunkelviolett. Die zweiwertigen Kupfer-Ionen werden dabei zu einwertigen Kupfer-Ionen reduziert. Diese einwertigen Kupfer-Ionen reagieren nun in einem zweiten Schritt mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure zu einem violett farbigen Komplex. Die Absorption der farbigen Reaktionskomplexe kann anschließend mittels Spektrophotometer bei 562 nm gemessen werden.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit BSA (BSA, bovines Serumalbumin) nach Vorgaben des Kits angesetzt, welche anschließend als Referenz für die ermittelten Absorptionswerte diente (siehe Tab. 19).

Tabelle 21: Standard-Verdünnungsreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung. Dargestellt ist das Pipettierschema für der herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe.

Standard	RIPA-Puffer in µl	Verdünnung	BSA Konzentration in µg/ml
A	0	300 µl aus BCA-Kit	2000
B	125	375 µl aus BCA-Kit	1500
C	325	325 µl aus BCA-Kit	1000
D	175	175 µl aus B	750
E	325	325 µl aus C	500
F	325	325 µl aus E	250
G	325	325 µl aus F	125
H	400	100 µl aus G	25
I	400	0	0 = Blank

Anschließend wurden jeweils 10 µl Standard in eine 96-Well vorgelegt. Die zu bestimmenden Proben wurden 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt und ebenfalls zu jeweils 10 µl in die 96-Well Platte pipettiert. Dabei erfolgte die Bestimmung des Standards doppelt, die der Proben dreifach. Mit Hilfe einer Multipipette wurde daraufhin in jedes befüllte Well 200 µl BCA-Reagenz (Reagenz A:B, 50:1) pipettiert. Im Folgenden wurde die 96-Well Platte für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die einzelnen Absorptionen der Farbumschläge in den Wells bei 562 nm im Spektrophotometer gemessen. Die Auswertung und Berechnung der Gesamtproteinmenge anhand der Referenzverdünnungsreihe erfolgte mit Hilfe der aufgeführten Software.

3.3.3 Probenvorbereitung

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die für die SDS-Page und Western-Blot zu untersuchenden Proben bei 4 °C auf Eis aufgetaut. Alle anschließenden Schritte erfolgten ebenfalls bei 4 °C auf Eis. Um einheitliche Proteinmengen aufzutragen, wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert. Dazu wurden jeweils 5 µl Auftragspuffer nach Lämmli pipettiert. Um zu der einheitlichen Proteinmenge auch ein einheitliches Probenvolumen zu erreichen, wurden alle Proben gegebenenfalls mit RIPA-Stocklösung auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nachdem die Proben für fünf Sekunden anzentrifugiert wurden, wurden sie bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert um sekundäre und tertiäre Proteinstrukturen aufzubrechen. Gleichzeitig werden durch die im Auftragspuffer enthaltende Thiolverbindung, Dithiotreitol (DDT, Dithiotreitol), Disulfidbrücken reduziert und somit die natürliche Faltung der Proteine aufgehoben. Nach beendeter Denaturierung wurden die Proben erneut für fünf Sekunden anzentrifugiert und bis zum Befüllen der Auftragstaschen der SDS-Page bei 4 °C auf Eis gelagert.

3.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-Page

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese handelt es sich um ein biochemisch-analytisches Verfahren, bei dem Proteine allein aufgrund ihrer Molekülmasse in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS, sodium dodecyl sulfate) dient dabei als anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung der Proteine. Damit nehmen alle Proteine eine negative Ladung an und können so ausschließlich aufgrund ihrer Molekülmasse und nicht entsprechend Ihrer Ladung elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Als Gelelektrophorese-System wurde ein System der Firma *Bio-Rad Laboratories GmbH* verwendet. Als Trenngel wurde ein 8%iges und als Sammelgel ein 4%iges Polyacrylamidgel gewählt (siehe Tab. 20). Mit Ausnahme des Radikalstarters Ammoniumperoxidsulfat (APS, Ammoniumperoxidsulfat) und des Polymerisierungskatalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED, Tetramethylethyldiamin) wurden alle Bestandteile des Gels in ein 50 ml Becherglas pipettiert. Um einer Verunreinigung mit Fremdproteinen zu entgehen wurden alle Glasplatten für die Gelkammern vorher sorgfältig mit Isopropanol gereinigt, nach entsprechenden Angaben des Herstellers zusammengebaut und in der im System enthaltenen Haltevorrichtung befestigt. Nach Zugabe von APS und TEMED zu den restlichen Bestandteilen des Gels wurde nun zuerst das Trenngel in die Gelkammer gegossen und zügig mit einer dünnen Schicht Isopropanol überschichtet, um eine gerade obere Kante zu erhalten. Nach Auspolymerisation des Gels wurde das Isopropanol wieder abgenommen und verbliebende Rückstände wurden vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel analog dem Trenngel gegossen. Abschließend wurden die Probenkämme eingesetzt und gewartet, bis das Gel vollständig auspolymerisierte.

Tabelle 22: Chemikalien für Trenngel und Sammelgel. Dargestellt sind alle benötigten Chemikalien und Volumina, die für die Herstellung von jeweils 4 Trenn- und Sammelgelen benötigt werden.

Lösung	8%iges Trenngel	4%iges Sammelgel
AA/BIS	5 ml	2 ml
Puffer	Lower-Gel-Puffer: 3,75 ml	Upper-Gel-Puffer: 3,3 ml
ddH ₂ O	6,3 ml	7,8 ml
TEMED	50 µl	40 µl
APS (10%)	90 µl	90 µl

Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, wurde es in die für die Elektrophorese vorgesehene Elektrophorese-Kammer eingebaut und die Kammer mit 1x Laufpuffer befüllt. Nun wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt und die Auftragstaschen des Gels mit Hilfe einer Mikroliterspritze mit 1x Laufpuffer gespült. Um später das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine abschätzen zu können und eine Identifikation der Banden zu ermöglichen, wurde jeweils die erste Auftragstasche mit 5 µl Proteinmarker befüllt. Anschließend wurden die restlichen Proben mittels Mikroliterspritze in die Auftragstaschen aufgetragen.

Nachdem alle Proben aufgetragen wurden, wurde die Elektrophorese-Kammer an das Stromversorgungsgerät angeschlossen und eine konstante Spannung von 70 V eingestellt. Die Proben durchliefen das Sammelgel in etwa 30 Minuten und sammelten sich an dem Übergang zu dem Trenngel. Die Spannung wurde nun auf 90 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn sich das Bromphenolblau des Auftragspuffers an der Unterkante des Trenngels gesammelt hatte.

3.3.5 Western-Blot

Beim Western-Blot handelt es sich wie bei der SDS-Page um ein biochemisch-analytisches Verfahren. Die nach der Gelelektrophorese vertikal aufgetrennten und sich nun im Polyacrylamidgel befindlichen Proteine werden mittels Elektrotransfer auf eine Trägermembran übertragen. Dabei wandern die nun negativ geladenen Proteine durch ein senkrecht zur Laufrichtung des Gels gerichtetes elektrisches Feld in Richtung Anode. Als Trägermembran diente hierbei eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, Polyvinylidenfluorid), an der die Proteine durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen haften bleiben. Mit Hilfe von spezifischen Primär- und Sekundärantikörpern können Proteine anschließend selektiv dargestellt und quantifiziert werden.

Der Elektrotransfer der Proteine wurde mittels Wet-Blot-Verfahren und einem System der Firma *Bio-Rad Laboratories GmbH* durchgeführt. In Vorbereitung für den Elektrotransfer wurden für jedes Gel 2 Filterpapiere und eine PVDF-Membran auf die passende Größe des Gels zugeschnitten. Die für den Wet-Blot zusätzlich benötigten Schwämme und Filterpapiere wurden in 1x Transferpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde für fünf Minuten in Methanol aktiviert und anschließend ebenfalls in 1x Transferpuffer inkubiert. Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Gele aus der Elektrophoresekammer entnommen und der Blotaufbau vorbereitet. Der Blotaufbau erfolgte mit Hilfe von Gel-Halter-Kassetten, wobei zunächst ein Schwamm und anschließend ein Filterpapier auf die Seite der Kathode platziert wurden. Nun wurde vorsichtig die vordere Glasplatte der Gelkammer abgenommen und das Sammelgel mit einem Spatel entfernt. Auf das Gel wurden nun zuerst die PVDF-Membran und darüber ein Filterpapier platziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst keine Luftblasen zwischen Gel und PVDF-Membran entstehen. Im Anschluss erfolgte das Lösen des Gels von der hinteren Glasplatte der Gelkammer. Es wurde nun samt PVDF-Membran und Filterpapier auf das kathodenseitige Filterpapier gelegt, wobei wiederum darauf geachtet wurde, dass möglichst keine Luftblasen entstehen. Anschließend wurde noch ein Schwamm auf das Filterpapier gelegt und die Gel-Halter-Kassette zusammengebaut. Der komplette Blotaufbau gestaltet sich nun wie folgt: Kathode-Schwamm-Filterpapier-Gel-PVDF-Membran-Filterpapier-Schwamm-Anode. So wird gewährleistet, dass die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung PVDF-Membran bzw. Anode wandern. Die Gel-Halter-Kassetten wurden anschließend in die dafür vorgesehene Transferkammer eingebaut und die Kammer mit 1x Transferpuffer befüllt. Nach Vorgabe des Herstellers wurde zusätzlich ein Kühlakku in die Transferkammer eingelegt. Nach dem Anschließen an die Stromquelle lief der Blotvorgang bei konstanter Stromstärke von 400 mA für eine Stunde.

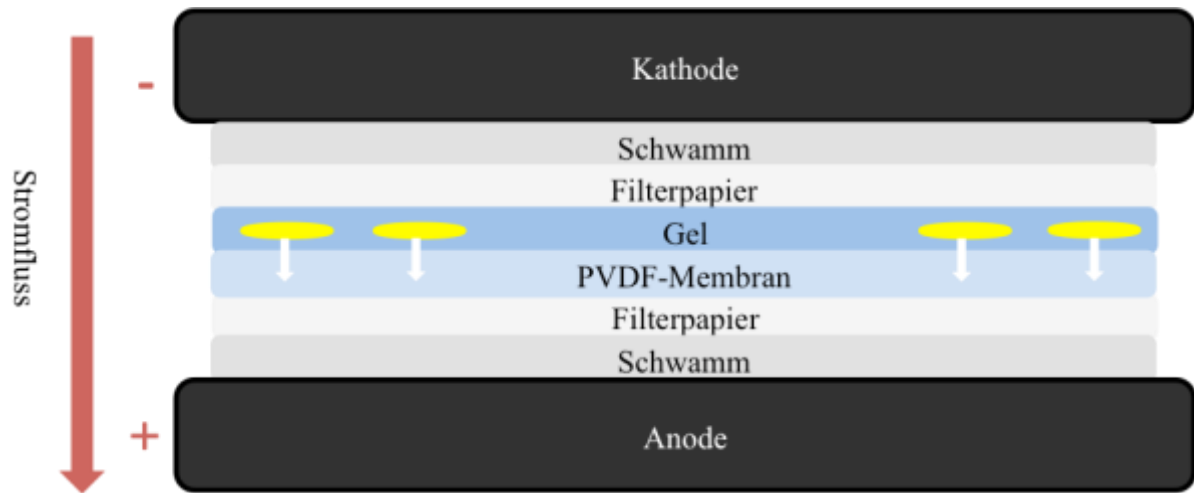


Abbildung 7: *Schematischer Aufbau einer Western-Blot-Apparatur.* Dargestellt sind die einzelnen Bestandteile des Blotaufbaus, sowie der Stromfluss und die Laufrichtung der Proteine (Pfeil).

3.3.6 Membranfärbung

Um den Erfolg des Proteintransfers auf die PVDF-Membran zu überprüfen, wurden die einzelnen Membranen im Anschluss an den Proteintransfer mit einer Ponceau-Färbelösung gefärbt. Dabei handelt es sich um eine schnelle, einfache und reversible Färbemethode, bei der der rote Azofarbstoff des Ponceaus an die Aminogruppe der Proteine bindet und die Proteinbanden so auf der PVDF-Membran sichtbar macht.

Dafür wurden die PVDF-Membranen nach erfolgtem Proteintransfer in eine Plastikwanne mit 0,5%iger Ponceau-Färbelösung gelegt und für fünf Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Membranen in einer weiteren Plastikwanne mit Aqua dest. wieder entfärbt und die Proteinbanden wurden langsam sichtbar.

3.3.7 Antikörperbehandlung

Nach erfolgreicher Ponceau-Färbung der Membranen wurden die Membranen zunächst für eine Stunde in 2%iger BSA/TBS-T-Lösung (TBS-T, Tris-buffered saline-Tween®20) blockiert um alle freien und unspezifischen Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Nachdem freie und unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden, wurden die Membranen mit der entsprechenden Antikörperverdünnung behandelt und in Folie eingeschweißt.

Um die zu untersuchenden Proteine selektiv darzustellen, wurden Antikörperverdünnungen der entsprechenden Primärantikörper nach empfohlenen Angaben des Herstellers in 1%iger BSA/TBS-T-Lösung angesetzt. Alle Verdünnungen, Primär- und Sekundärantikörper sowie Inkubationszeiten sind der Tabelle zu entnehmen (siehe Tab. 21). Nach Ablauf der Inkubationszeit mit den entsprechenden Primärantikörpern folgte die Inkubation mit den jeweiligen Sekundärantikörpern. Dafür wurden die eingeschweißten Membranen aus den Folien genommen und zuerst dreimal für fünf Minuten in TBS-T gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Membranen mit den Sekundärantikörpern behandelt und ebenfalls in Folie eingeschweißt. Sekundärantikörper, Verdünnungen und Inkubationszeiten sind gleichfalls der Tabelle zu entnehmen (siehe Tab. 21).

Tabelle 23: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper. Dargestellt sind alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, sowie deren Herstellerfirma, verwendete Verdünnungen und Inkubationszeiten.

Protein	Primärantikörper		Sekundärantikörper	
	Firma	Verdünnung und Inkubationszeit	Firma	Verdünnung und Inkubationszeit
p-ERK-1/2	Maus-anti-p-ERK-1/2 (monoklonal) Sc-7383 <i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i>	1:500 in 1% BSA/TBS-T ü.N. bei 4 °C + 30 min bei RT	Kaninchen-anti-Maus-IgG-HRP (polyklonal) A 9044 <i>Sigma-Aldrich® Chemie GmbH</i>	1:500 in 1% BSA/TBS-T 1 h bei RT
ERK-1/2	Kaninchen-anti-ERK-1/2 (polyklonal) Sc-153 <i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i>	1:500 in 1% BSA/TBS-T ü.N. bei 4 °C + 30 min bei RT	Maus-anti-Kaninchen-IgG-HRP (monoklonal) A 1949 <i>Sigma-Aldrich® Chemie GmbH</i>	1:500 in 1% BSA/TBS-T 1 h bei RT

p-p38-MAPK	Kaninchen-anti-p-p38 (Tyr 182) (polyklonal) Sc-7975-R <i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i>	1:200 in 1% BSA/TBS-T ü.N. bei 4 °C + 30 min bei RT	Maus-anti-Kaninchen-IgG-HRP (monoklonal) A 1949 <i>Sigma-Aldrich® Chemie GmbH</i>	1:1000 in 1% BSA/TBS-T 1 h bei RT
p38-MAPK	Kaninchen-anti-p38 (polyklonal) Sc-728 <i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i>	1:100 in 1% BSA/TBS-T ü.N. bei 4 °C + 30 min bei RT	Maus-anti-Kaninchen-IgG-HRP (monoklonal) A 1949 <i>Sigma-Aldrich® Chemie GmbH</i>	1:1000 in 1% BSA/TBS-T 1 h bei RT
β-Aktin	Maus-anti-β-Aktin (monoklonal) ab6276 <i>abcam®</i>	1:10.000 in 1% BSA/TBS-T ü.N. bei 4 °C + 30 min bei RT	Kaninchen anti-Maus-IgG-HRP (polyklonal) A 9044 <i>Sigma-Aldrich® Chemie GmbH</i>	1:5000 in 1% BSA/TBS-T 1 h bei RT
Connexin-43	Kaninchen-anti-Connexin-43 (polyklonal) C 6219 <i>Sigma-Aldrich® Chemie GmbH</i>	1:2000 in 1% BSA/TBS-T ü.N. bei 4 °C + 30 min bei RT	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP (polyklonal) A 9169 <i>Sigma-Aldrich® Chemie GmbH</i>	1:5000 in 1% BSA/TBS-T 1 h bei RT
GAPDH	Maus-anti-Kaninchen GAPDH (monoklonal) #5G4 <i>HyTest Ltd.</i>	1:10.00 in 1% BSA/TBS-T ü.N. bei 4 °C + 30 min bei RT	Kaninchen-anti- Maus-IgG- HRP (polyklonal) A 9044 <i>Sigma-Aldrich® Chemie GmbH</i>	1:5000 in 1% BSA/TBS-T 1 h bei RT

3.3.8 Detektion

Die Detektion der Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe von Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpern und einem zugesetzten Chemilumineszenz-Substrat. Als Chemilumineszenz-Substrat wurde das *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate-Kit* der Firma *Thermo Scientific* verwendet. Bei der Chemilumineszenz handelt es sich um eine chemische Reaktion, bei der durch Oxidation eines Substrats ein angeregtes Zwischenprodukt entsteht, welches kurze Zeit später wieder in den Grundzustand übergeht. Dabei wird während des Übergangs dieses angeregten Zwischenprodukts in den Grundzustand Licht emittiert, welches später auf dem Röntgenfilm als schwarze Bande zu erkennen ist.

Nach Ablauf der Inkubation mit den jeweiligen Sekundärantikörpern wurden die Membranen erneut dreimal für fünf Minuten in TBS-T gewaschen. Anschließend wurden jeweils 5 ml Chemilumineszenz-Lösung auf die Membranen gegeben und nach zeitlicher Vorgabe des Herstellers für fünf Minuten inkubiert. Überschüssige Chemilumineszenz-Lösung wurde anschließend mit Papiertüchern entfernt und die Membranen wurden in eine Röntgenfilmkassette übertragen. Die Belichtung und Entwicklung der Filme erfolgte in einer Dunkelkammer. Die Belichtungszeiten wurden so gewählt, dass die schwarzen Banden gut sichtbar und untereinander abgrenzbar waren. Für die Entwicklung wurden die Filme nach der Belichtung zuerst in Entwicklerlösung getränkt, wobei allmählich die schwarzen Banden zu erkennen waren. Die Filme wurden anschließend mit Wasser abgespült und schließlich in Fixierlösung getränkt. Nach dem Fixieren wurden die Filme noch einmal gründlich mit klarem Wasser abgespült und getrocknet. Für die sich anschließende densitometrische Auswertung wurden alle Filme beschriftet und eingescannt.

3.3.9 Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung der eingescannten Filme erfolgte mit Hilfe Programms *Quantity-One®*. Die Intensität wurde dabei als Schwärzungsintensität pro Fläche der jeweiligen Bande angegeben, wobei zusätzlich eine Hintergrundreduktion durchgeführt wurde. Um die so erhaltenen Rohdaten verschiedener Proben miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte mit den densitometrischen Werten des Referenzproteins GAPDH der jeweiligen Probe normiert.

3.3.10 Stripping

Um mehr als ein Protein auf der PVDF-Membran nachzuweisen, wurden die Membranen nach erfolgter Detektion des ersten Zielproteins gestripped, das heißt, gebundene Primär- und Sekundärantikörper werden von der PVDF-Membran gelöst.

Durch den sehr sauren pH-Wert der Stripping-Solution werden Antikörperbindungen denaturiert und gelöst. Gleichzeitig reduziert das in der Stripping-Solution enthaltende β -Mercaptoethanol Disulfidbrücken und löst so ebenfalls Antikörperbindungen auf.

Die Membranen wurden dafür mit Stripping-Solution für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen dreimal für fünf Minuten in TBS-T gewaschen und anschließend erneut für eine Stunde in 2%iger BSA/TBS-T Lösung blockiert. Danach konnten die Membranen erneut mit einer Primärantikörperverdünnung behandelt werden (siehe Tab. 21).

3.4 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest, ELISA

Bei dem Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA, Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest) handelt es sich um ein biochemisch-immunologisches Verfahren, bei dem Proteine, aber auch andere niedermolekulare Verbindungen, wie zum Beispiel bestimmte Hormone, nachgewiesen und quantifiziert werden können. Grundlage dafür sind spezifische Antigen- Antikörper- Wechselwirkungen, wobei das Zielprotein das jeweilige Antigen darstellt.

Alle Versuche wurden mittels der Sandwich-ELISA Technik durchgeführt. Im Vergleich zu der einfachen ELISA-Methode werden dabei zwei Antikörper verwendet, die gegen das gesuchte Zielprotein gerichtet sind. Dabei wurde eine entsprechende Mikrotiterplatte vom Hersteller mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen das jeweilige Zielprotein gerichtet ist. Durch Zugabe von Zellkulturmedium bzw. Zellkulturüberstand binden die darin befindlichen Zielproteine mittels Antigen- Antikörperbindung an die an der Mikrotiterplatte fixierten Antikörper. In einem zweiten Schritt bindet ein weiterer spezifischer monoklonaler Antikörper an das Antigen. Dieser Antikörper ist zusätzlich mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Nach Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrats und anschließender Farbreaktion kann die optische Dichte der entstandenen Farbreaktion gemessen und die Konzentration des Zielproteins berechnet werden.

Für die Durchführung der Versuche wurden Kits der Firma *R&D Systems, Inc.* verwendet. Für den Nachweis und die Quantifizierung der Wachstumsfaktoren TGF- β , IGF-1 und FGFb im basalen Zellkulturmedium und im Zellkulturüberstand wurde der entsprechende ELISA jeweils streng nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden zuerst die benötigten Lösungen, Standards und Kontrollen hergestellt. Die Vorbereitung der Proben geschah ebenfalls nach Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils 50 μ l eines Assay-Diluents in die Wells für Standard, Proben und Kontrolle vorgelegt und anschließend 50 μ l Standard, Probe und Kontrolle hinzu pipettiert. Standards wurden dabei doppelt, Proben und Kontrolle dreifach bestimmt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von zwei Stunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells viermal mit Waschpuffer gewaschen und jeweils 100 μ l des zweiten, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten, Antikörpers hinzugegeben. Es folgte eine weitere zweistündige Inkubation. Nach Ablauf dieser zweiten Inkubationszeit wurden die Wells erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ l Chemilumineszenz-Substrat. Die Farbreaktion wurde mit 100 μ l einer Stopplösung nach 30 Minuten abgestoppt. Die Messung der optischen Dichte

erfolgte im Photospektrometer bei 450 nm, eine Korrekturmessung wurde bei 560 nm durchgeführt.

Mittels linearer Regressionsanalyse wurde anhand der korrigierten Standardwerte eine Eichgerade erstellt und die Konzentration der jeweiligen Proteine konnte berechnet werden.

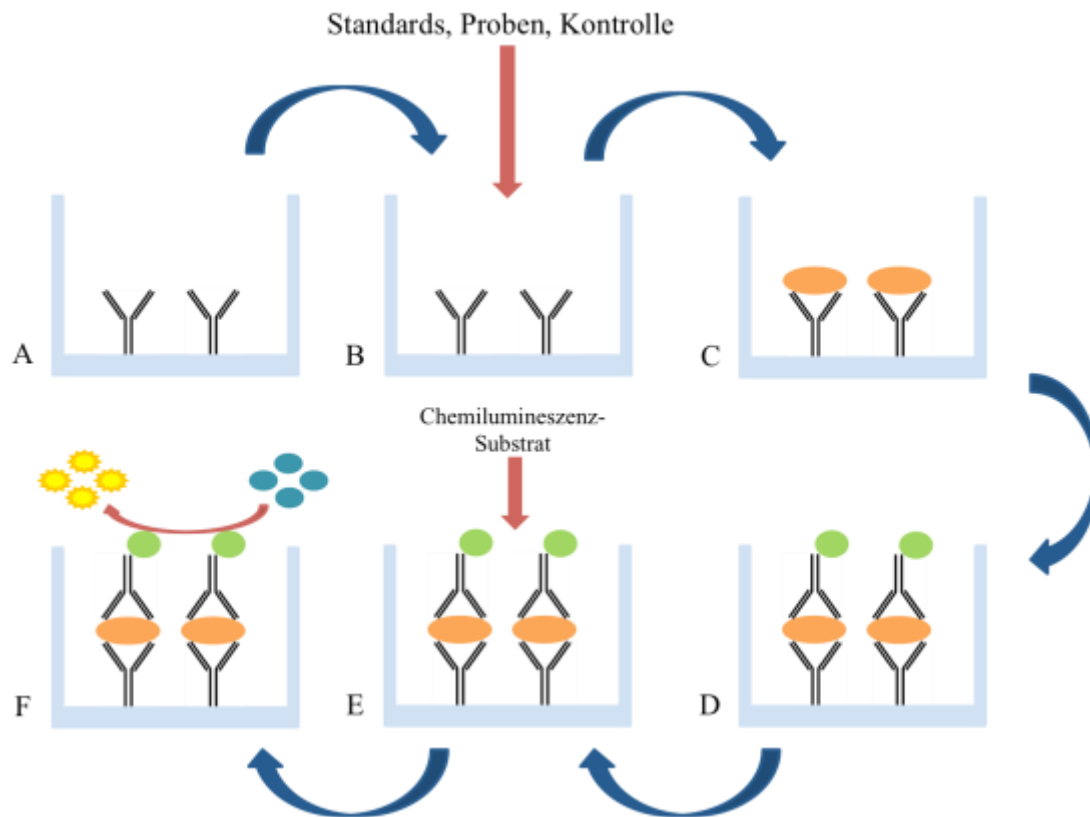


Abbildung 8: **Schematischer Ablauf eines Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstests.** Eine Mikrotiterplatte wurde vom Hersteller mit spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen gerichteten monoklonalen Antikörpern beschichtet (A). Standards, Proben und die Kontrolle werden hinzu pipettiert und das jeweilige Antigen bindet an die vorbeschichteten Antikörper (B), (C). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden nicht gebundene Substanzen durch mehrmaliges Waschen entfernt und ein zweiter, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper, der sich ebenfalls gegen das zu untersuchende Antigen richtet, wird in die Wells pipettiert (D). Nach erneuter Inkubation werden wieder alle nicht gebundenen Antikörper durch mehrmaliges Waschen entfernt und ein Chemilumineszenz-Substrat zu den Wells hinzugefügt (E), welches durch die Meerrettich-Peroxidase in ein blaues Zwischenprodukt umgewandelt wird. Um die Enzymreaktion abzustoppen, wird eine Stopplösung in die Wells pipettiert und das blaue Zwischenprodukt färbt sich gelb (F). Die Intensität der bei 450 nm gemessenen Farbreaktion ist proportional zur Menge des untersuchten Antigens und kann anschließend anhand der Standardkurve berechnet werden.

3.5 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm *Sigma Plot* verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des t-Tests und einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

Alle Daten, soweit nicht anders vermerkt, wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM, Standardfehler) dargestellt. Alle Versuche wurden mit $n = 3$ durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Isolation und Kultur neonataler ventrikulärer Kardiomyozyten

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, wurden für die Gewinnung ventrikulärer Kardiomyozyten 10-15 neonatale Ratten im Alter von höchstens 48 Stunden verwendet. In Abhängigkeit von jeweiligem Alter der Ratten und Beschaffenheit der verwendeten Kollagenase-II-Verdaulösung, haben sich am Ende jeder Präparation abweichende Gesamtzellzahlen pro Milliliter Zellsuspension ergeben.

Durch Herstellung einer 1:2 Verdünnung, bestehend aus Trypanblau und Zellsuspension, konnten mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer 700.000 bis 900.000 vitale Zellen pro ml Zellsuspension gezählt werden.

Da neben den ventrikulären Kardiomyozyten bei jeder Präparation auch Fibroblasten und Endothelzellen isoliert wurden, handelte es sich bei den Zellkulturen um Mischkulturen. Durch das 45-minütige „preplating“ und den Zusatz von Pferdeserum zum Zellkulturmedium konnte der Anteil an nicht-Kardiomyozyten jedoch unter 5% gehalten werden.

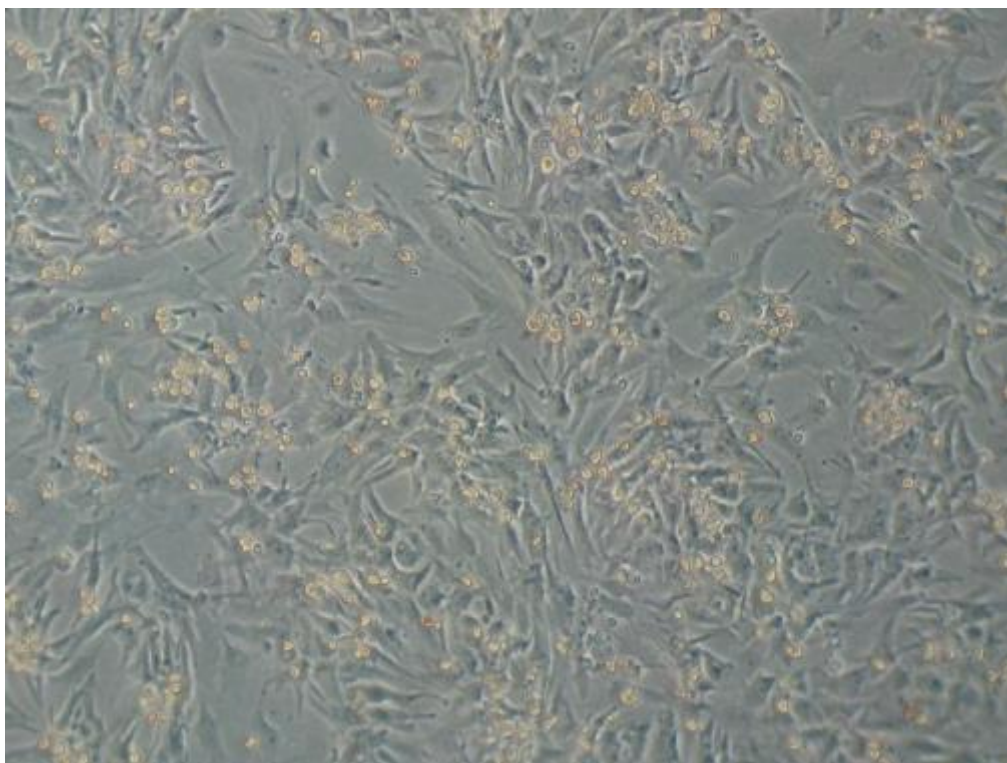


Abbildung 9: **Mikroskopische Aufnahme eines repräsentativen Bildausschnitts ventrikulärer Kardiomyozyten in Zellkultur.** Dargestellt sind repräsentative Cluster von kontrahierenden Kardiomyozyten. Die Aufnahme wurde in einer 50-fachen Vergrößerung aufgenommen.

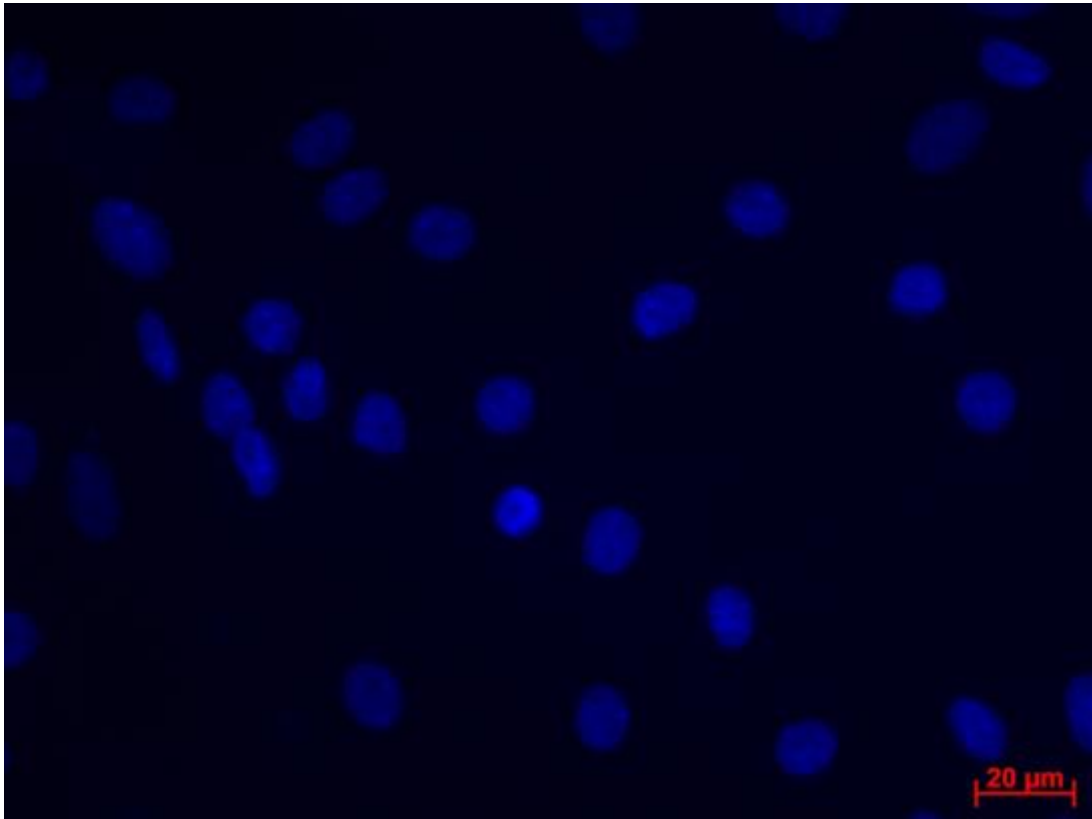
4.1 Connexin-43- und Troponin-I-Immunfluoreszenz Doppelfärbung

Um das Vorliegen von ventrikulären Kardiomyozyten nachzuweisen, wurden die Zellen mit der immunhistologischen Doppelfärbung für Troponin-I und Connexin-43 angefärbt. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit der DAPI-Färbung gefärbt.

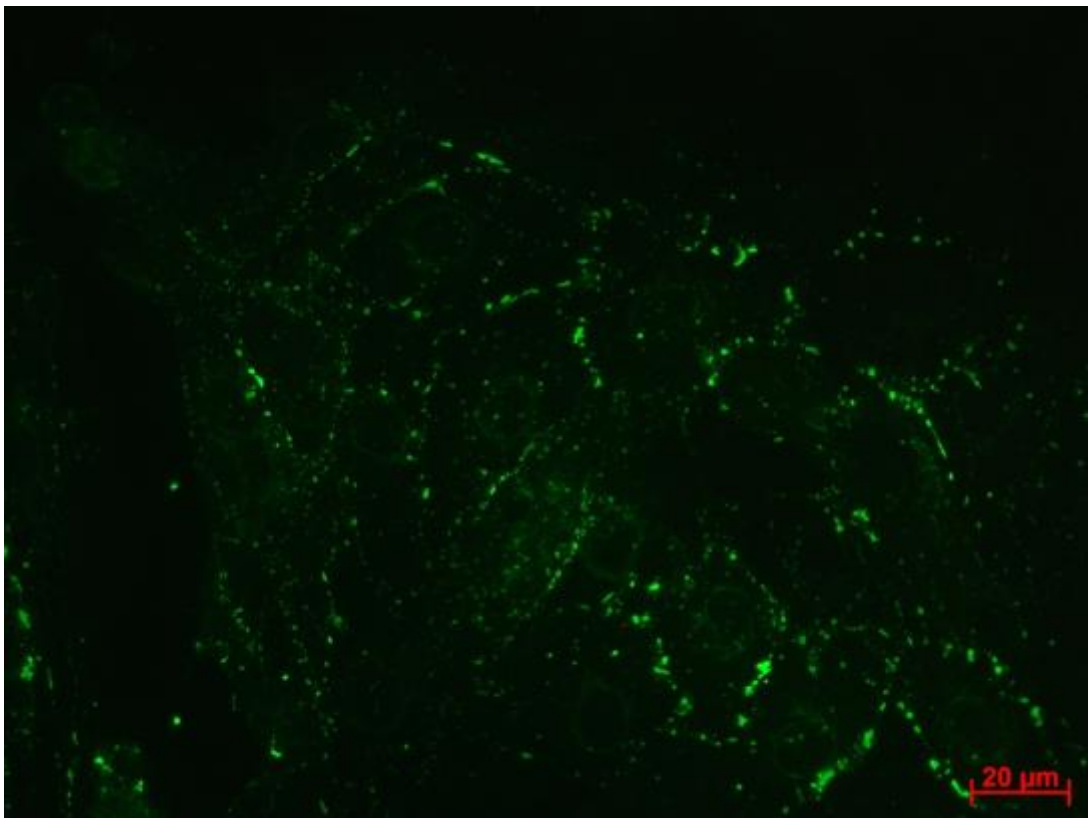
Im Gegensatz zu Troponin-C und Troponin-T, welche zusätzlich im Skelettmuskel exprimiert werden können, wird Troponin-I ausschließlich im Herzmuskel exprimiert und ist somit spezifisch für Kardiomyozyten (Anaya & Moliterno, 2013). Neben einer Reihe anderer Connexine, ist Connexin-43 die mit Abstand am häufigsten exprimierte Connexinisoform im ventrikulären Myokard und ist somit ebenfalls ein geeigneter Marker für ventrikuläre Kardiomyozyten (Duffy, Fort, & Spray, 2006).

Erwartungsgemäß konnten nach Abschluss der Färbung Troponin-I und Connexin-43 positive Zellen identifiziert werden (siehe Abb. 10). Fibroblasten und Endothelzellen waren negativ für Troponin-I und Connexin-43.

A



B



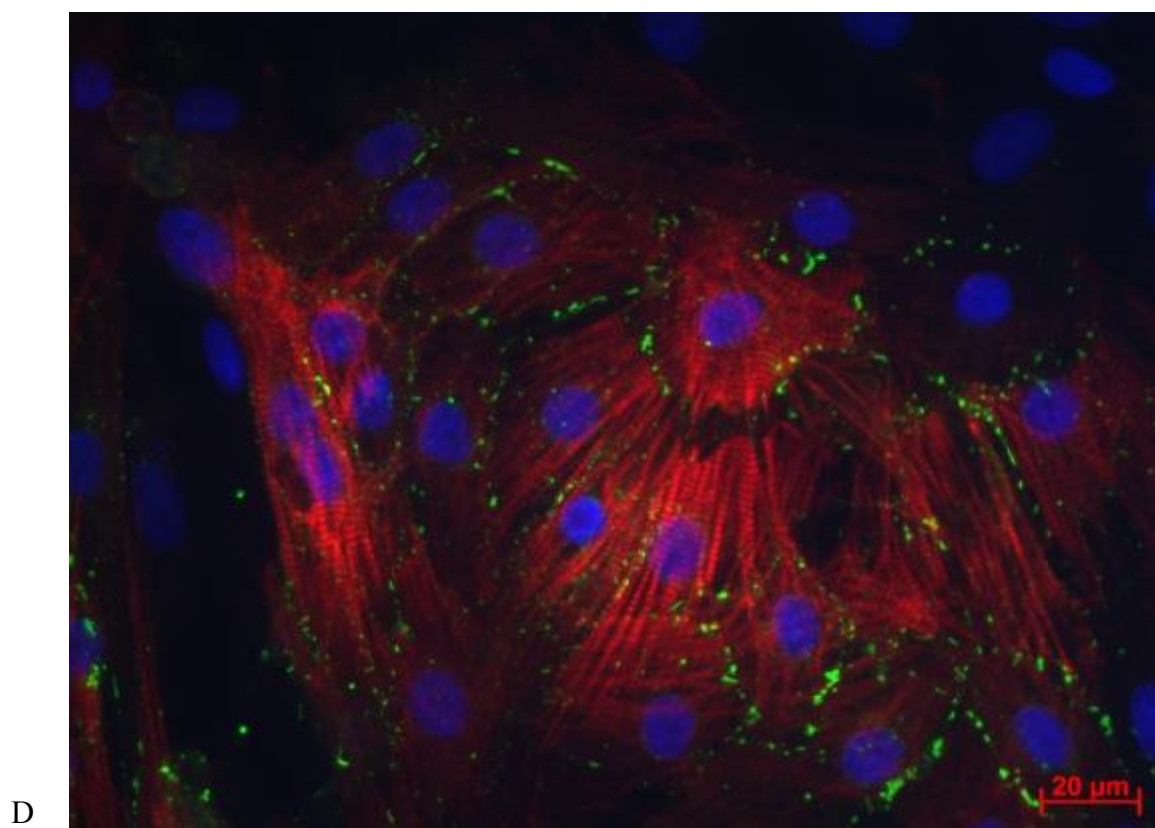
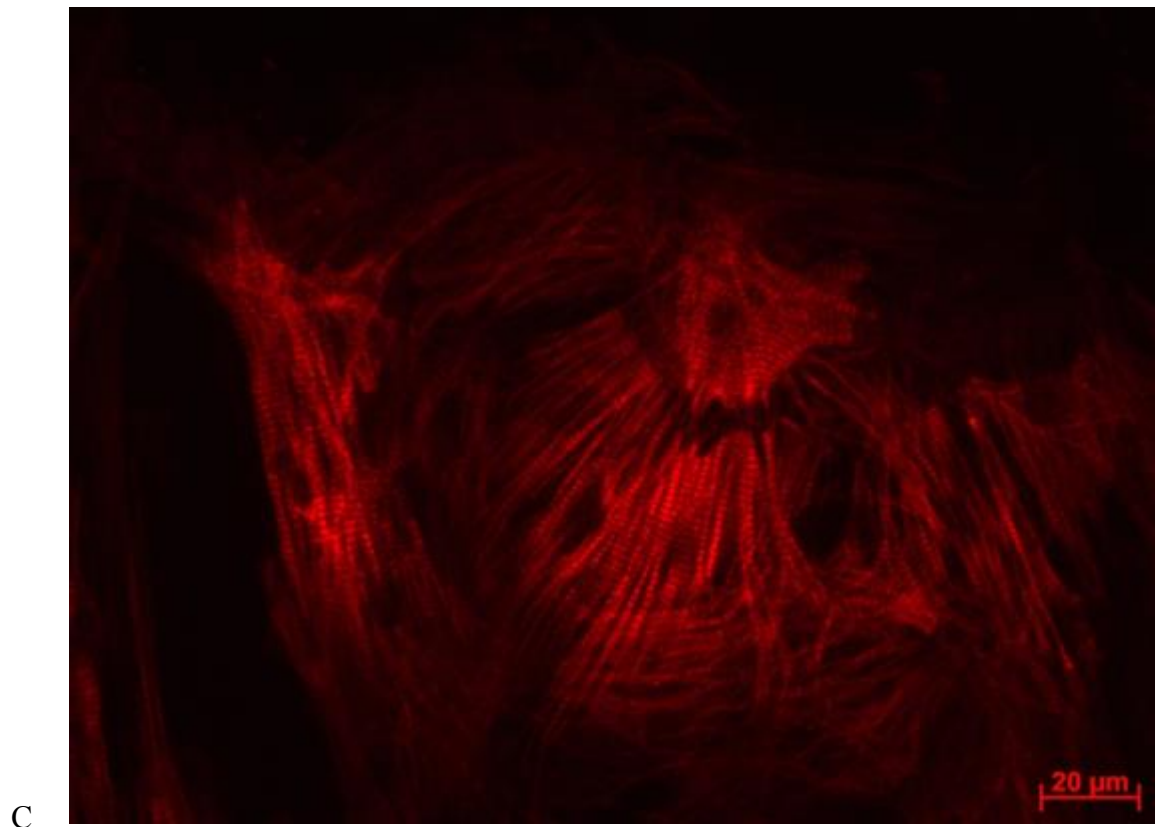


Abbildung 10: **Immunhistologische Aufnahme ventrikulärer Kardiomyozyten.** Dargestellt sind Zellkerne in blau (A), Connexin-43 in grün (B), Troponin-I in rot (C), sowie ein Überlagerungsbild aller Kanäle (D). Die Aufnahme wurde in einer 400-fachen Vergrößerung erstellt.

4.3 Ermittlung der Schlagfrequenzen

Obwohl darauf geachtet wurde, dass die Versuchsbedingungen und exogenen Faktoren der Präparation identisch waren, konnten starke Schwankungen in den Schlagfrequenzen der beiden Behandlungsgruppen beobachtet werden. Sowohl in der Behandlungsgruppe, in der Kardiomyozyten mit AKM behandelt wurden, als auch in der Behandlungsgruppe, in der Kardiomyozyten mit KKM behandelt wurden, kam es vor, dass nach der Behandlung bei optisch vitalen Zellen keine Schlagfrequenz ermittelt werden konnte. Auch konnte beobachtet werden, dass bei den Zellen, die mit regulärem Zellkulturmedium für Kardiomyozyten behandelt wurden, keine Schlagfrequenz bei optisch vitalen Zellen ermittelt werden konnte.

In der Behandlungsgruppe, in der die Zellen mit dem AKM behandelt wurden, konnte eine Schlagfrequenz von $105,37 \pm 5,04$ bpm nach 48 Stunden beobachtet werden. Nach 72 Stunden betrug die Schlagfrequenz für die unbehandelten Zellen $66,35 \pm 12,07$ bpm. Für die mit AKM behandelten Zellen betrug die Schlagfrequenz nach der 24-stündigen Behandlung $59,11 \pm 15,16$ bpm (siehe Abb. 11).

Schlagfrequenzen

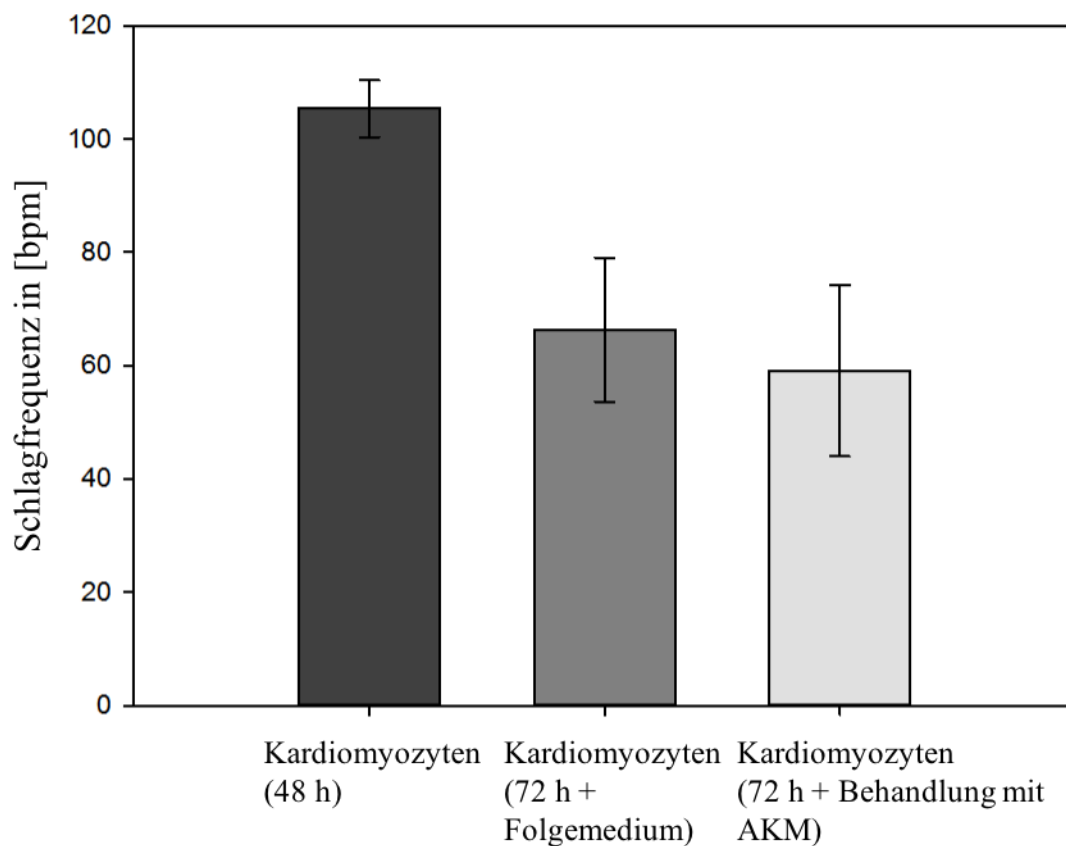


Abbildung 11: **Ermittelte Schlagfrequenzen.** Dargestellt sind die ermittelten Schlagfrequenzen der Kardiomyozyten jeweils nach 48 Stunden ohne Behandlung, nach 72 Stunden ohne Behandlung und nach 72 Stunden mit Behandlung durch AKM. Auf eine statistische Analyse wurde aufgrund zu geringer Versuchsanzahl verzichtet.

Für die andere Behandlungsgruppe, in der die Zellen mit dem KKM behandelt wurden, zeigte sich nach 48 Stunden eine Schlagfrequenz von $103,80 \pm 11,26$ bpm. Nach 72 Stunden betrug sie für die unbehandelten Zellen $122,40 \pm 16,70$ bpm. Dem gegenüber konnte eine Schlagfrequenz von $56,60 \pm 14,52$ bpm für die mit KKM behandelten Zellen nach der 24-stündigen Behandlung ermittelt werden (siehe Abb. 12).

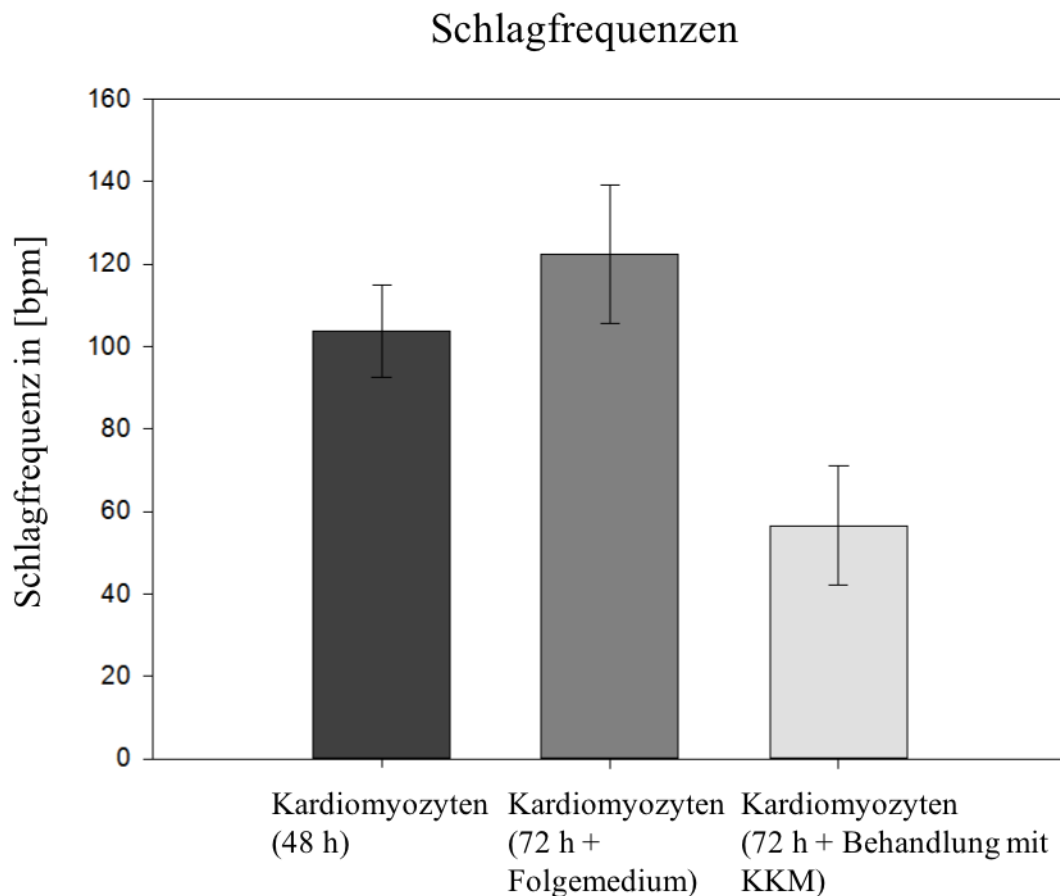


Abbildung 12: **Ermittelte Schlagfrequenzen.** Dargestellt sind die ermittelten Schlagfrequenzen der Kardiomyozyten jeweils nach 48 Stunden ohne Behandlung, nach 72 Stunden ohne Behandlung und nach 72 Stunden mit Behandlung durch KKM. Auf eine statistische Analyse wurde aufgrund zu geringer Versuchszahl verzichtet.

4.4 Isolation und Kultur von Adipozyten aus dem Nebenhodenfettpolster der männlichen adulten Ratte

Nach Abschluss der ersten 5-tägigen Inkubationszeit nach der Präparation konnten unter dem inversen Mikroskop erste, mit optisch sichtbaren Vakuolen gefüllte, Zellen identifiziert werden. Bei der Präparation des Fettgewebes und der enzymatischen Isolation der Adipozyten wurden ähnlich der Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten auch Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen zu einem geringen Anteil isoliert. Deshalb handelte es sich auch hierbei um eine Mischkultur. Die Auswertung der histologischen Oil-Red-O-Färbung ergab einen Anteil an Adipozyten von rund 10%.

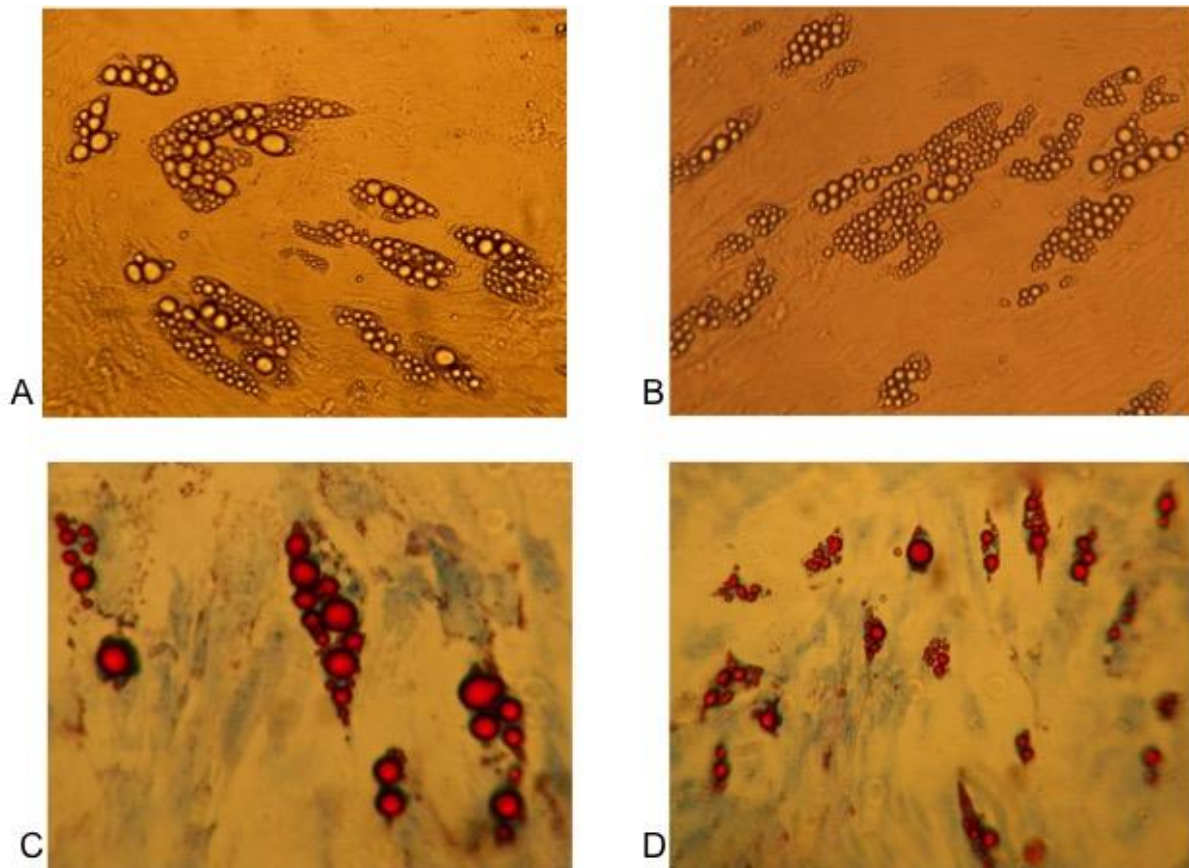


Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahme repräsentativer Bildausschnitte von Adipozyten. Dargestellt sind ungefärbte, native Adipozyten (A,B) und mit der Oil-Red-O-Färbung angefärbte Adipozyten (C,D) Die Aufnahmen wurden in einer 200-fachen Vergrößerung erstellt.

4.5 Biochemische Untersuchungen

Um die Expression der untersuchten Proteine Connexin-43, β -Aktin, p-ERK/ERK-1/2 und p-p38/p38-MAPK in den beiden Behandlungsgruppen zu quantifizieren, wurden jeweils 3 Western-Blot Untersuchungen für jedes Protein in den beiden Behandlungsgruppen durchgeführt. Dabei wurden bei jedem Western-Blot Proteinproben aufgetragen, die von der selben Präparation stammen. Pro Western-Blot wurden dabei drei bis vier Proteinproben von behandelten Zellen gegen die jeweils unbehandelten Zellen aufgetragen, die dabei als Kontrolle dienten.

4.5.1 Expression von Connexin-43

Connexin-43 ist ein Protein, welches sowohl in einer phosphorylierten (p-Connexin-43), als auch in der nicht-phosphorylierten (np-Connexin-43) Form vorkommt. Daher ergaben sich im Western-Blot zwei Banden, die sich in der Höhe von 43 kDa zwischen den beiden Markerbanden bei 35 kDa und 55 kDa befanden. Das Referenzprotein GAPDH wurde auf der Höhe von 37 kDa identifiziert (siehe Abb. 14 und 16).

Bei der densitometrischen Auswertung der Blots zeigte sich, dass die Behandlung mit dem AKM keinen statistisch signifikanten Einfluss ($p = 0.374$) gegenüber der Behandlung mit regulärem Zellkulturmedium hat. Unbehandelte Zellen zeigten eine Ratio von Connexin-43 zu GAPDH von $1,29 \pm 0,20$. Mit AKM behandelte Zellen zeigten eine Ratio von Connexin-43 zu GAPDH von $1,38 \pm 0,18$ (siehe Abb. 15).

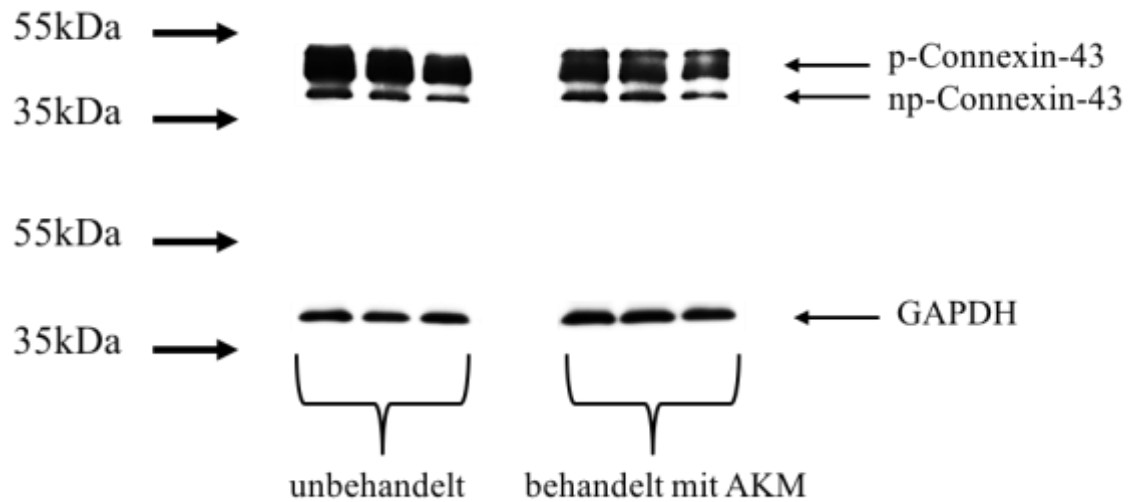


Abbildung 14: **Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten.** Dargestellt sind jeweils 3 Proteinproben für Connexin-43, welches im Western-Blot in phosphorylierter (p-Connxin-43) und in nicht-phosphorylierter (np-Connexin-43) Form erscheint, sowie das Referenzprotein GAPDH.

Expression von Connexin-43

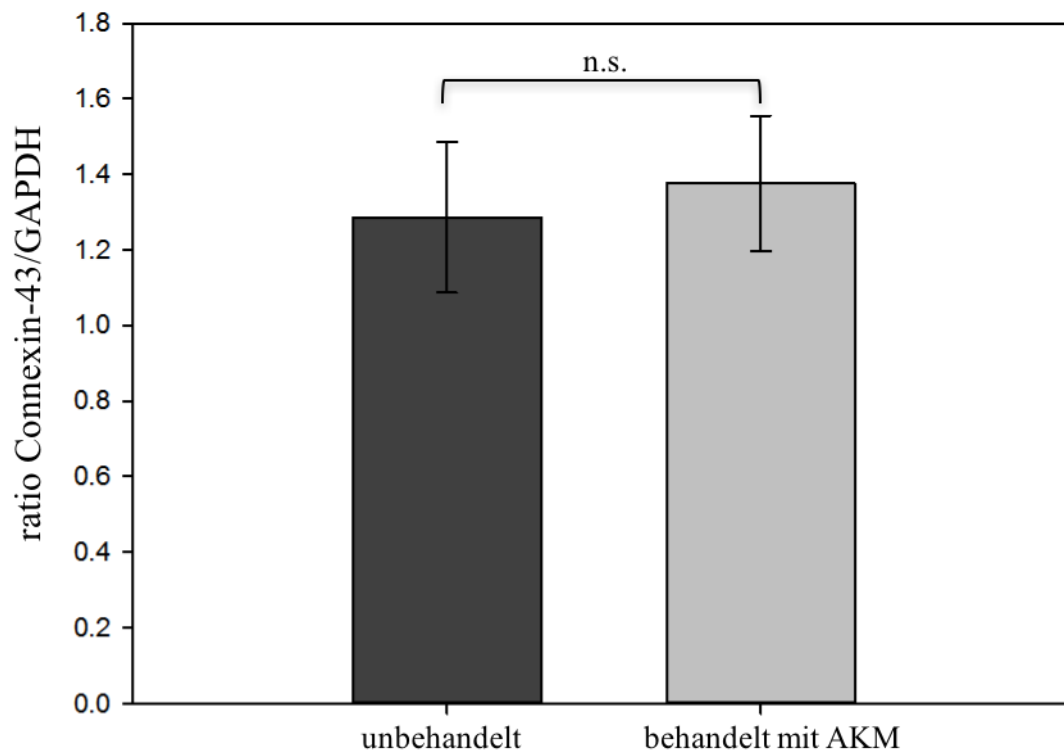


Abbildung 15: **Expression von Connexin-43.** Dargestellt ist die Ratio von Connexin-43 zu GAPDH in unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten.

Auch bei den Zellen, die mit KKM behandelt wurden, zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0.205$) zu den Zellen, die mit regulärem Zellkulturmedium behandelt wurden. Bei den unbehandelten Zellen wurde eine Ratio von Connexin-43 zu GAPDH von $1,13 \pm 0,09$ ermittelt. Bei den mit Kardiomyozytenüberstand behandelten Zellen ließ sich eine Ratio von Connexin-43 zu GAPDH von $1,33 \pm 0,22$ ermitteln (siehe Abb. 17).

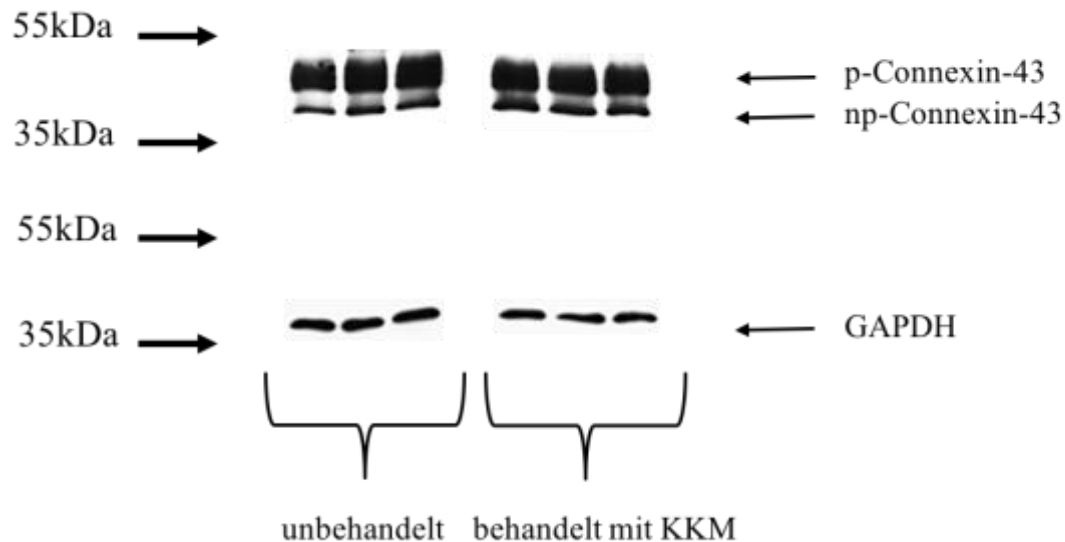


Abbildung 16: **Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit KKM behandelten Kardiomyozyten.** Dargestellt sind jeweils 3 Proteinproben für Connexin-43, welches im Western-Blot in phosphorylierter (p-Connexin-43) und in nicht phosphorylierter (np-Connexin-43) Form erscheint, sowie das Referenzprotein GAPDH.

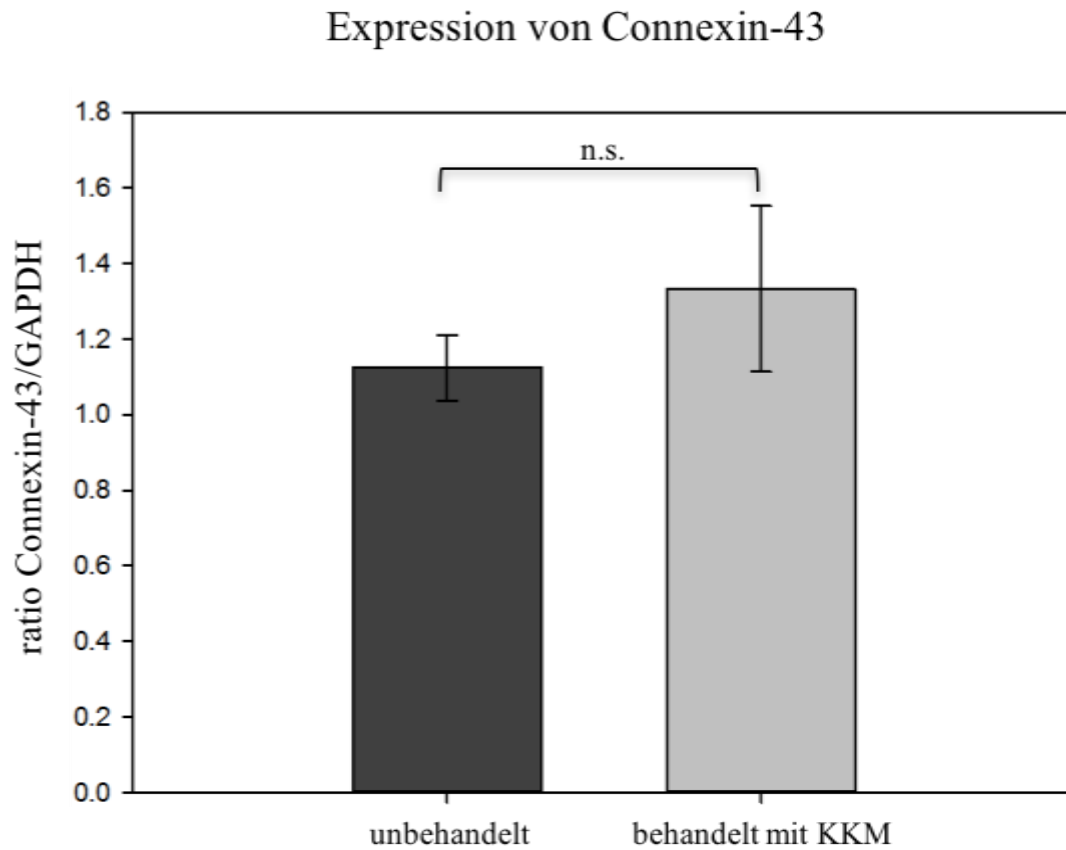


Abbildung 17: **Expression von Connexin-43.** Dargestellt ist die Ratio von Connexin-43 zu GAPDH für unbehandelte und mit KKM behandelte Kardiomyozyten.

Neben dem Gesamt-Connexin-43 wurde ebenfalls die Ratio von p-Connexin-43 zu np-Connexin-43 bestimmt. In beiden Behandlungsgruppen zeigte sich auch in der jeweiligen Ratio kein signifikanter Unterschied, weswegen auf eine Darstellung der Daten verzichtet wurde.

4.5.2 Expression von β -Aktin

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Behandlung der Zellen ein hypertrophes Wachstum induziert, wurde das Protein β -Aktin als Bestandteil des Zytoskeletts und Marker zellulärer Hypertrophie quantitativ bestimmt.

β -Aktin besitzt eine Molekülmasse von 42 kDa und wurde als einfache Bande zwischen den Markerbanden 35 kDa und 55 kDa identifiziert. Als Referenzprotein diente analog zu den anderen Untersuchungen GAPDH (siehe Abb. 18 und 20).

Kardiomyozyten, die mit AKM behandelt wurden, exprimierten das Protein β -Aktin statistisch signifikant weniger ($p = 0,004$) im Vergleich zu den Zellen, die nicht behandelt wurden. Es wurde eine Ratio von β -Aktin zu GAPDH von $0,76 \pm 0,07$ für mit AKM behandelte Zellen und eine Ratio von β -Aktin zu GAPDH von $1,16 \pm 0,11$ für unbehandelte Zellen ermittelt (siehe Abb. 19).

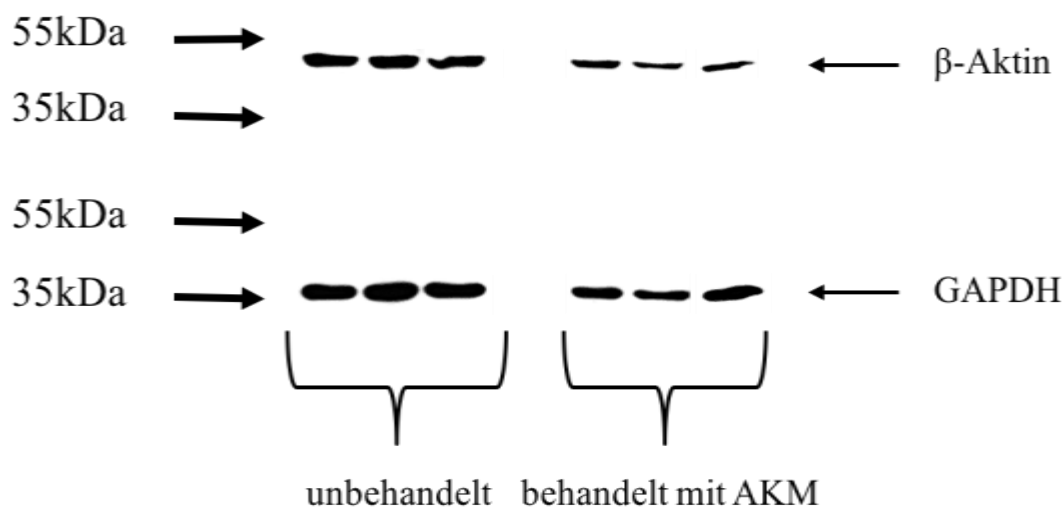


Abbildung 18: **Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten.** Dargestellt sind jeweils 3 Proteinproben für β -Aktin, sowie das Referenzprotein GAPDH.

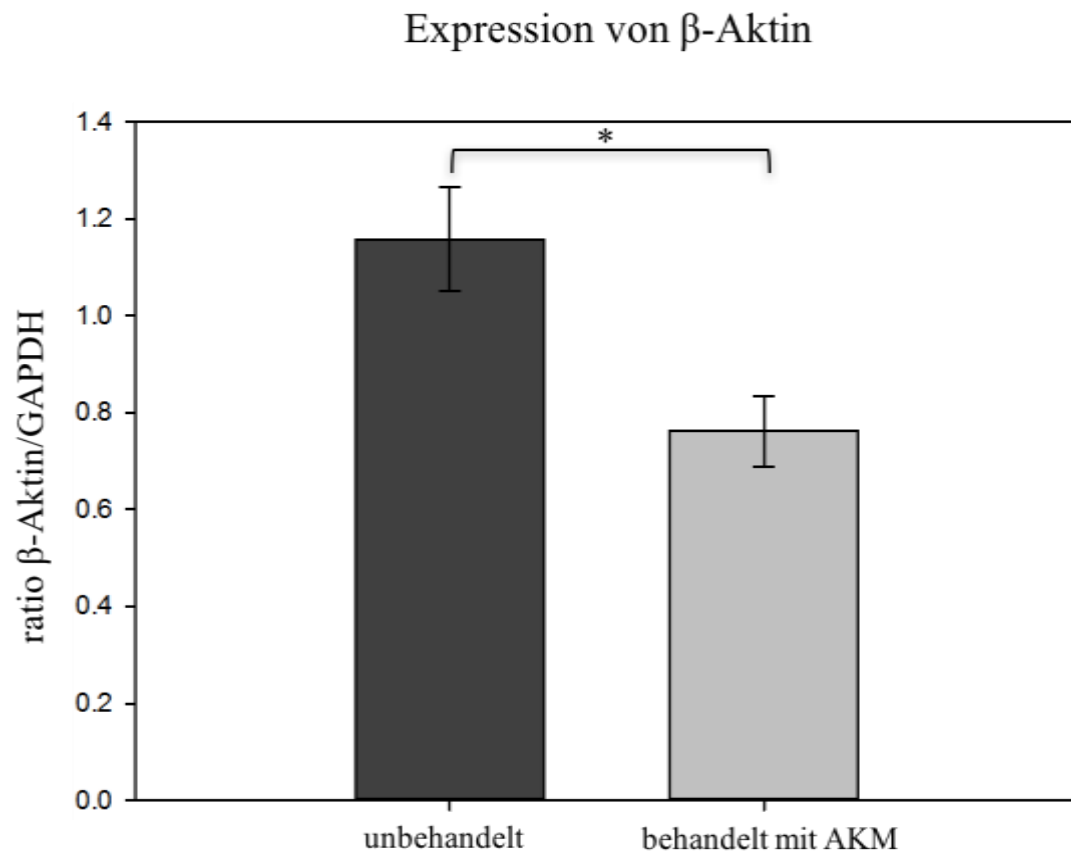


Abbildung 19: **Expression von β -Aktin.** Dargestellt ist die Ratio von β -Aktin zu GAPDH in unbehandelten und mit AKM behandelte Kardiomyozyten. (* $p < 0,05$)

Für Kardiomyozyten, die mit KKM behandelt wurden, ließ sich verglichen mit unbehandelten Kardiomyozyten keine statistisch signifikante Veränderung ($p = 0,229$) in der Expression von β -Aktin feststellen. Es ergab sich ein Ratio von β -Aktin zu GAPDH von $0,93 \pm 0,09$ für mit Kardiomyozytenüberstand behandelte Zellen und eine entsprechende Ratio von $0,82 \pm 0,12$ für nicht behandelte Zellen (siehe Abb. 21).

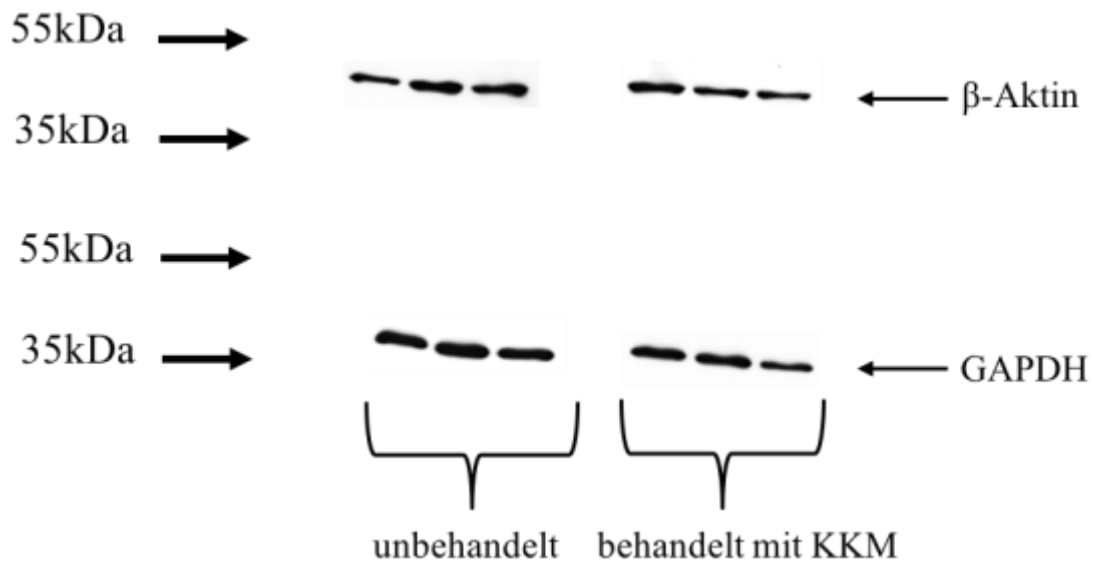


Abbildung 20: Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit KKM behandelten Kardiomyozyten. Dargestellt sind jeweils 3 Proteinproben für β -Aktin, sowie das Referenzprotein GAPDH.

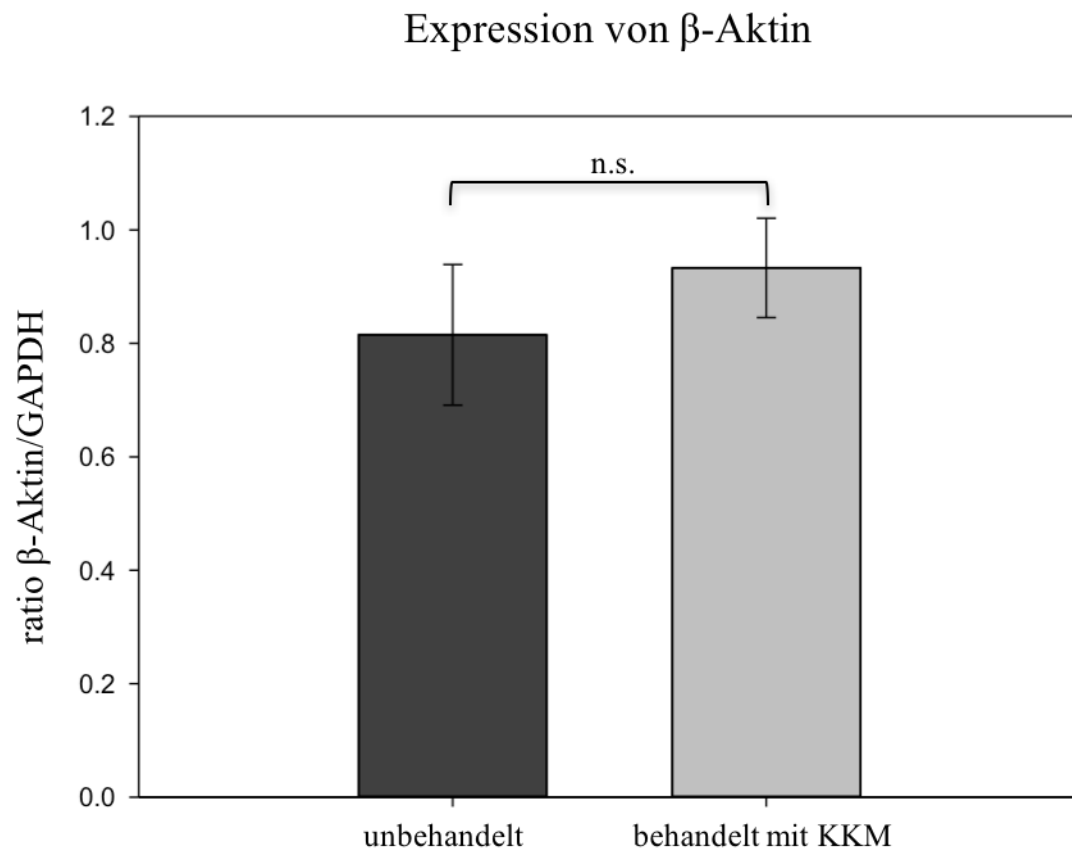


Abbildung 21: **Expression von β -Aktin.** Dargestellt ist die Ratio von β -Aktin zu GAPDH in unbehandelten und mit KKM behandelte Kardiomyozyten.

4.5.3 Expression von p-ERK/ERK-1/2

Neben β -Aktin als Marker zellulärer Hypertrophie wurden zusätzlich die beiden extrazellulär Signal-regulierten Kinasen ERK-1 und ERK-2 untersucht. Hypertrophe Stimuli bewirken dabei eine Phosphorylierung und damit Aktivierung der jeweiligen Kinase, an deren Ende der Signalkaskade eine zelluläre Hypertrophieantwort steht (siehe Kapitel 1.3).

Sowohl die phosphorylierten (p-ERK-1/2), als auch die nicht-phosphorylierten (ERK-1/2) Formen wurden im Western als Doppelbande bei 42 kDa und bei 44 kDa zwischen den beiden Markerbanden 35 kDa und 55 kDa identifiziert. Die Proteinbande bei 42 kDa stellte dabei p-ERK/ERK-2 und die Proteinbande bei 44 kDa die p-ERK/ERK-1 dar (siehe Abb. 22 und 24).

Bei den Kardiomyozyten, die mit AKM behandelt wurden, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber unbehandelten Kardiomyozyten festgestellt werden. Eine statistische Tendenz war dennoch in den Blots und den densitometrischen Auswertungen ersichtlich ($p = 0,074$). Es ergab sich eine Ratio von p-ERK-1/2 zu ERK-1/2 von $0,42 \pm 0,07$ für mit AKM behandelte Zellen. Dem gegenüber konnte eine Ratio von $0,59 \pm 0,09$ für unbehandelte Zellen ermittelt werden (siehe Abb. 23).

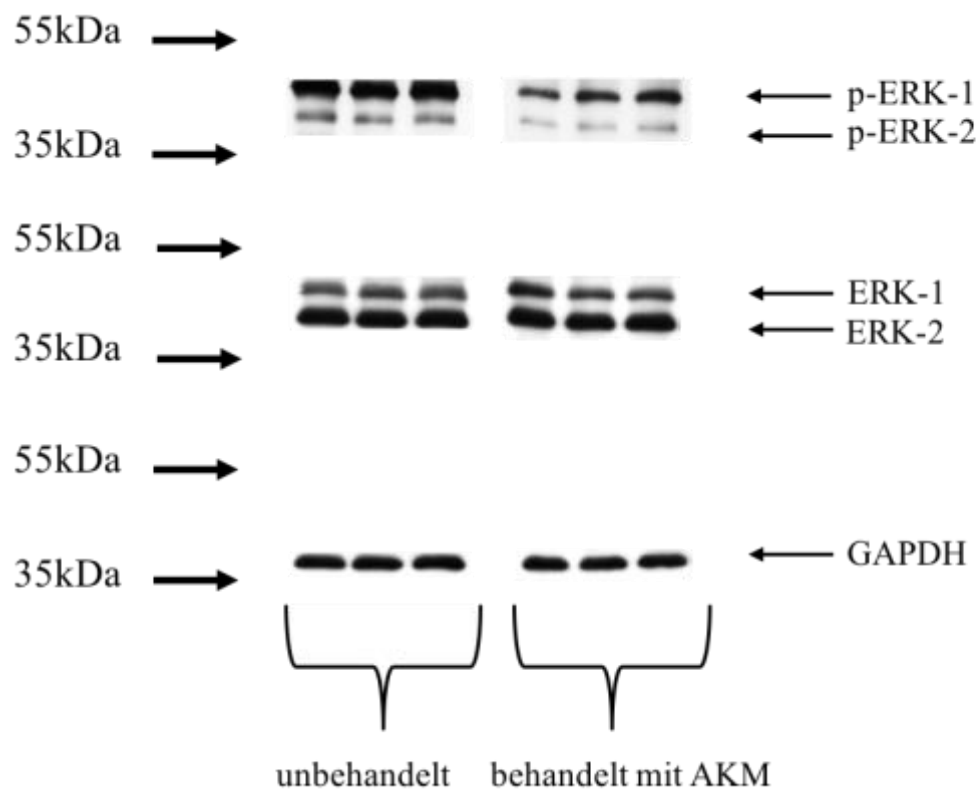


Abbildung 22: *Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten. Dargestellt sind jeweils 3 Proteinproben für p-ERK-1/2, ERK-1/2 sowie das Referenzprotein GAPDH.*

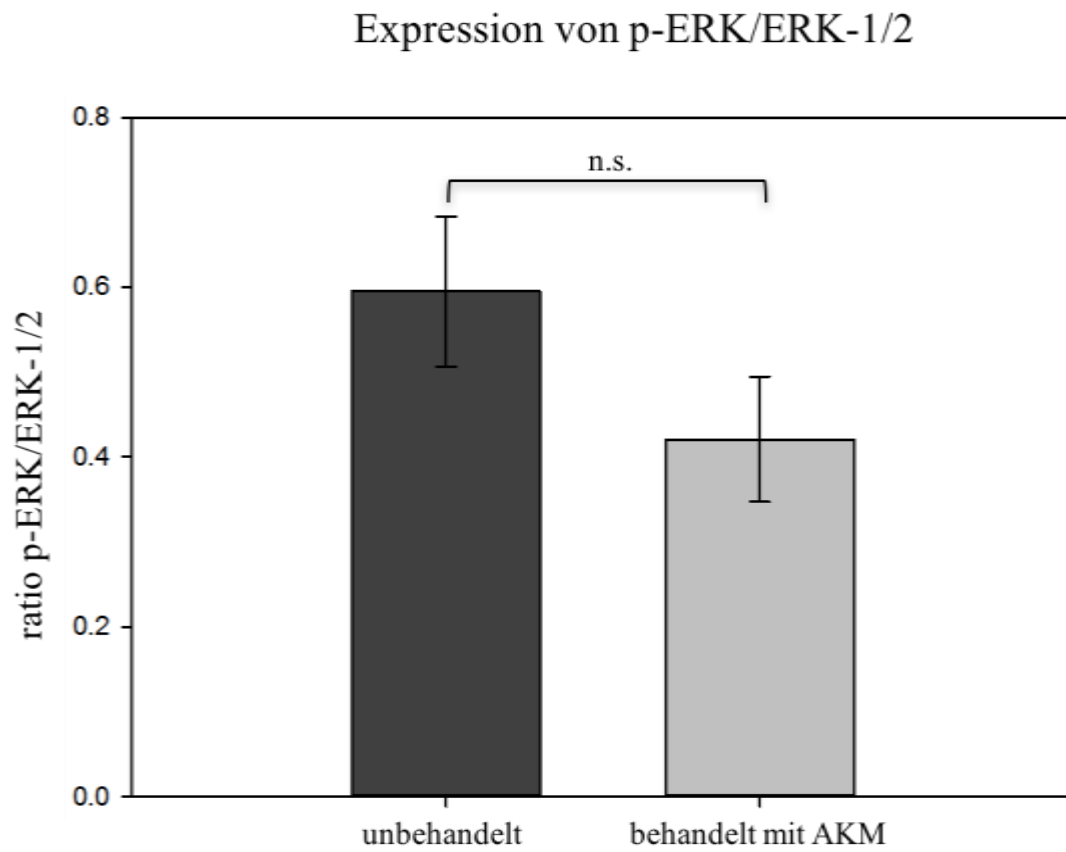


Abbildung 23: **Expression von p-ERK/ERK-1/2.** Dargestellt ist die Ratio von p-ERK/ERK-1/2 in unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten.

Für die Behandlungsgruppe, in der die Kardiomyozyten mit KKM behandelt wurden, stellte sich ebenfalls heraus, dass die Behandlung der Zellen keinen statistisch signifikanten Einfluss ($p = 0,352$) gegenüber unbehandelten Zellen hatte. Es konnte eine Ratio von p-ERK-1/2 zu ERK-1/2 von $0,95 \pm 0,15$ für mit KKM behandelte Zellen und eine Ratio von $0,88 \pm 0,10$ für unbehandelte Zellen berechnet werden (siehe Abb. 25).

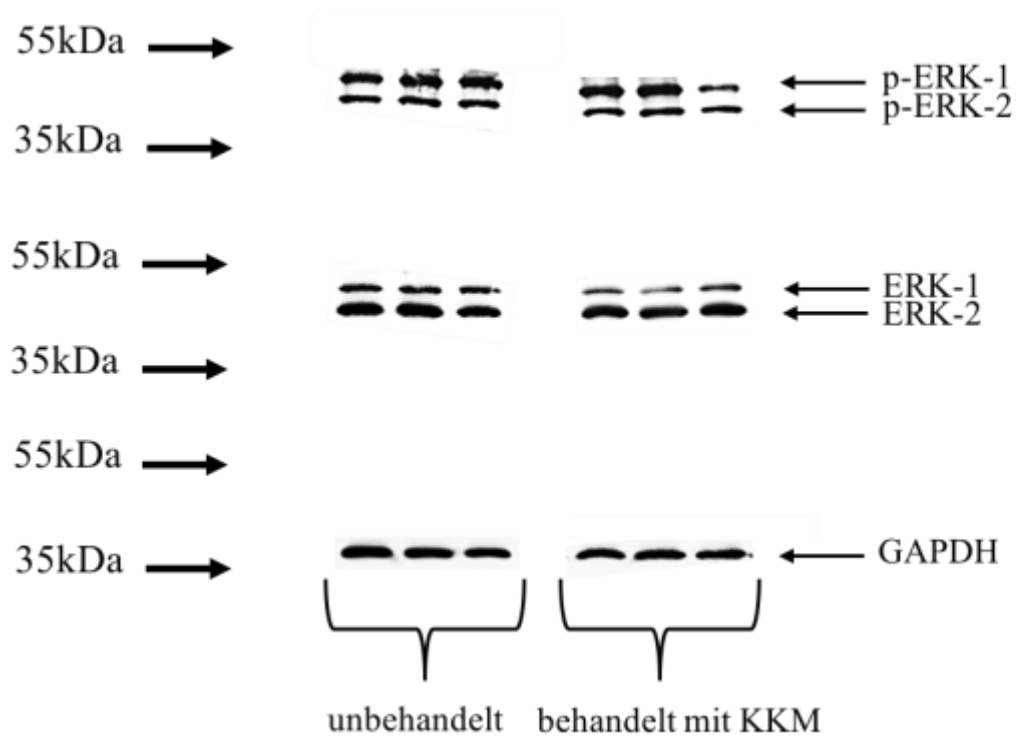


Abbildung 24: Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit KKM behandelten Kardiomyozyten. Dargestellt sind jeweils 3 Proteinproben für p-ERK-1/2, ERK-1/2 sowie das Referenzprotein GAPDH.

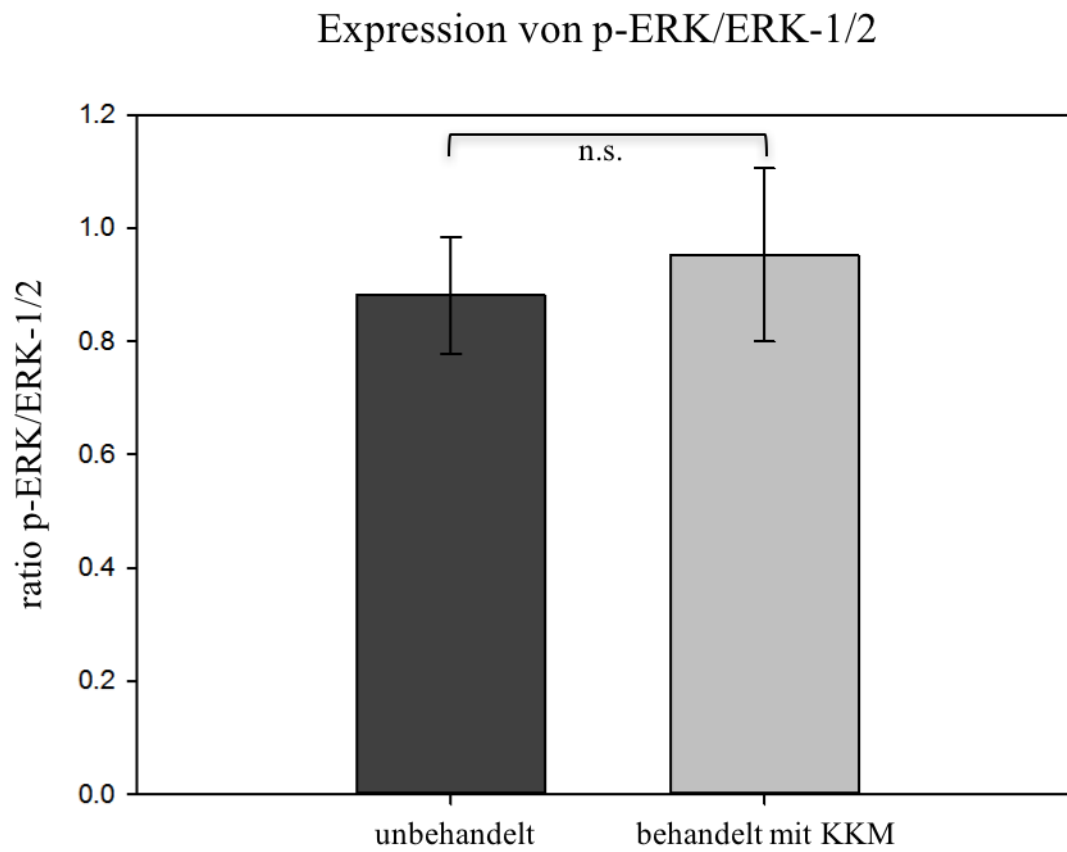


Abbildung 25: **Expression von p-ERK/ERK-1/2.** Dargestellt ist die Ratio von p-ERK/ERK-1/2 in unbehandelten und mit KKM behandelten Kardiomyozyten.

4.5.4 Expression von p-p38/p38-MAPK

Neben der Expression von p-ERK/ERK-1/2 spielt auch die Expression von p-p38/p38-MAPK eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion hypertropher Stimuli (siehe Kapitel 1.3). Ähnlich der ERKs kommt auch die p38-MAPK in einer phosphorylierten (p-p38-MAPK) und in einer nicht-phosphorylierten (p38-MAPK) Form vor. Die phosphorylierte Form ist hier ebenfalls die aktive Form. Im Western-Blot wurde sowohl die phosphorylierte, als auch die nicht-phosphorylierte Form als einfache Proteinbande bei 38 kDa zwischen den beiden Markerbanden bei 35 kDa und 55 kDa identifiziert (siehe Abb. 26 und 28).

Bei der Auswertung zeigte sich, dass die Behandlung mit AKM einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression von p-p38-MAPK hat. Kardiomyozyten, die mit AKM behandelt wurden, exprimierten die phosphorylierte Form statistisch signifikant weniger ($p = 0,01$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Für mit AKM behandelte Kardiomyozyten ergab sich eine Ratio für p-p38-MAPK zu p38-MAPK von $1,2 \pm 0,18$ gegenüber $3,2 \pm 0,73$ für unbehandelte Zellen (siehe Abb. 27).

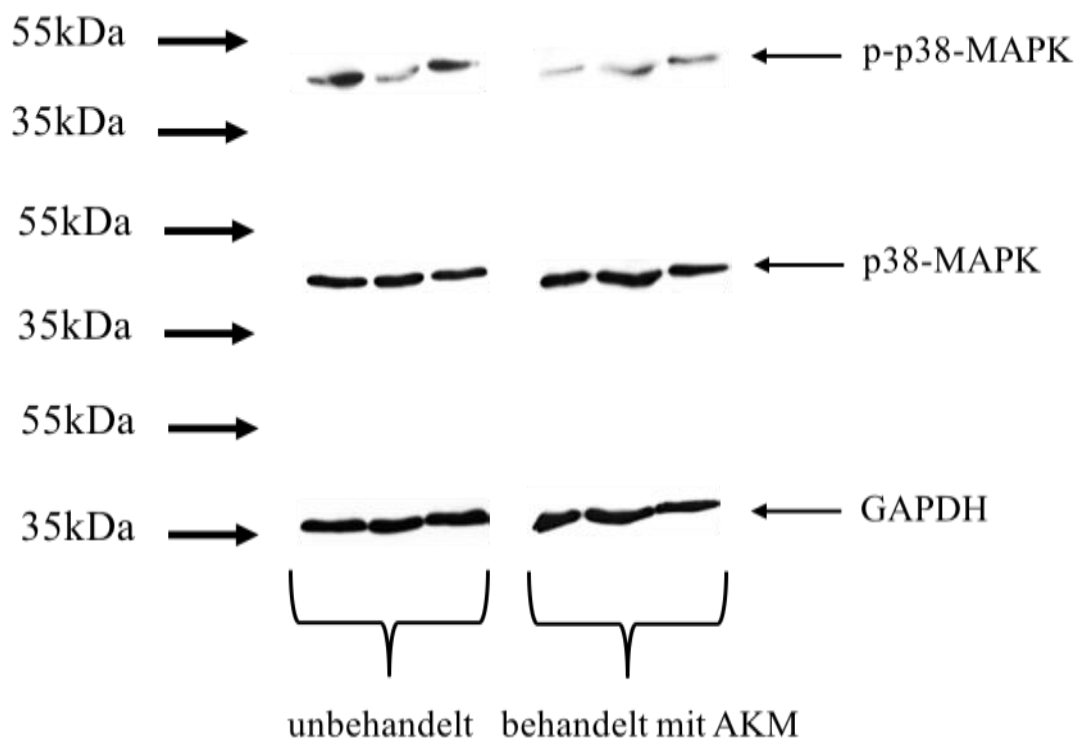


Abbildung 26: **Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten.** Dargestellt sind jeweils 3 Proteinproben für p-p38-MAPK, p38-MAPK sowie das Referenzprotein GAPDH.

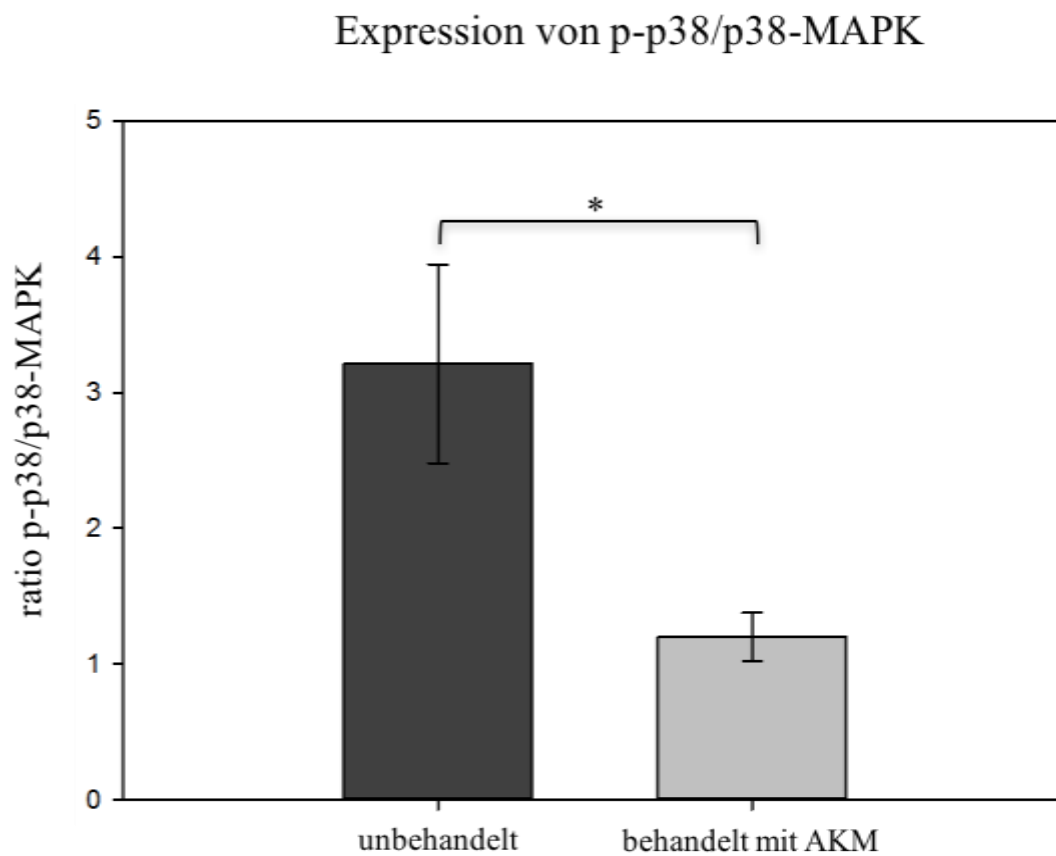


Abbildung 27: **Expression von p-p38/p38-MAPK.** Dargestellt ist die Ratio von p-p38/p38-MAPK in unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten. (* $p < 0,05$)

Die Behandlung von Kardiomyozyten mit KKM zeigte hingegen keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,292$) gegenüber unbehandelten Zellen. Es konnte eine Ratio von p-p38-MAPK zu p38-MAPK von $0,86 \pm 0,14$ für unbehandelte Zellen und eine Ratio von $1,05 \pm 0,14$ für Zellen, die mit KKM behandelt wurden, ermittelt werden (siehe Abb. 29).

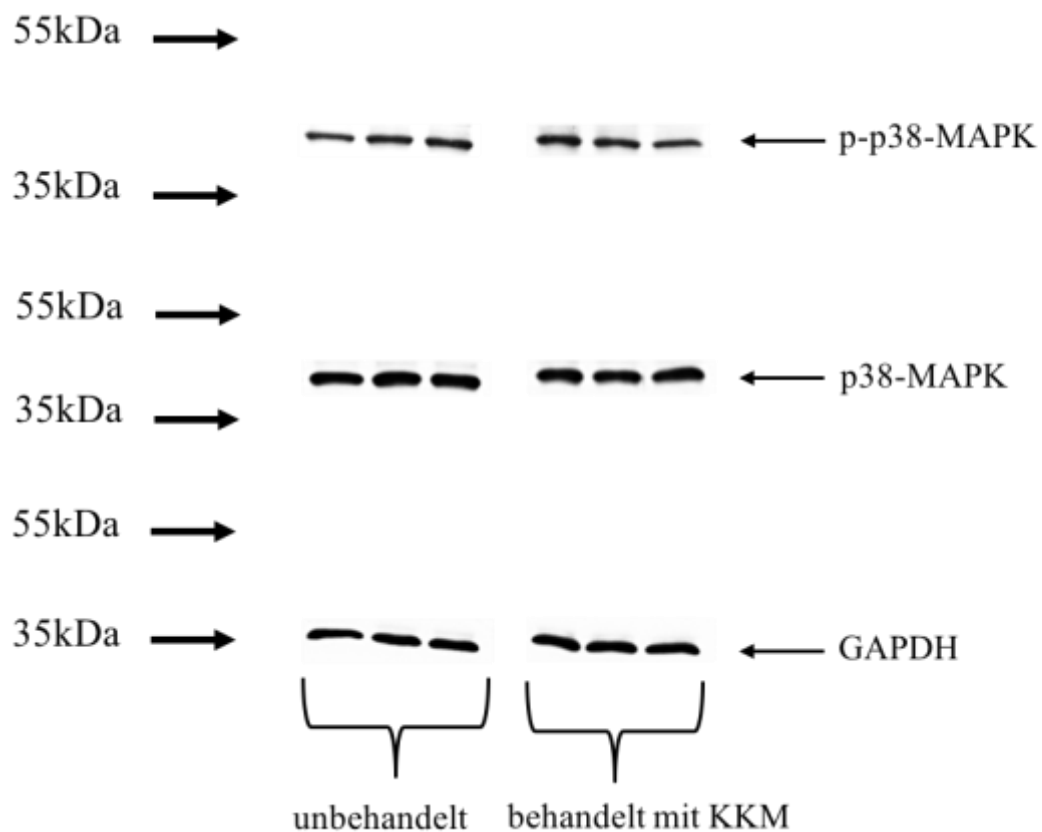


Abbildung 28: **Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit KKM behandelten Kardiomyozyten.** Dargestellt sind jeweils 3 Proteinproben für p-p38-MAPK, p38-MAPK sowie das Referenzprotein GAPDH.

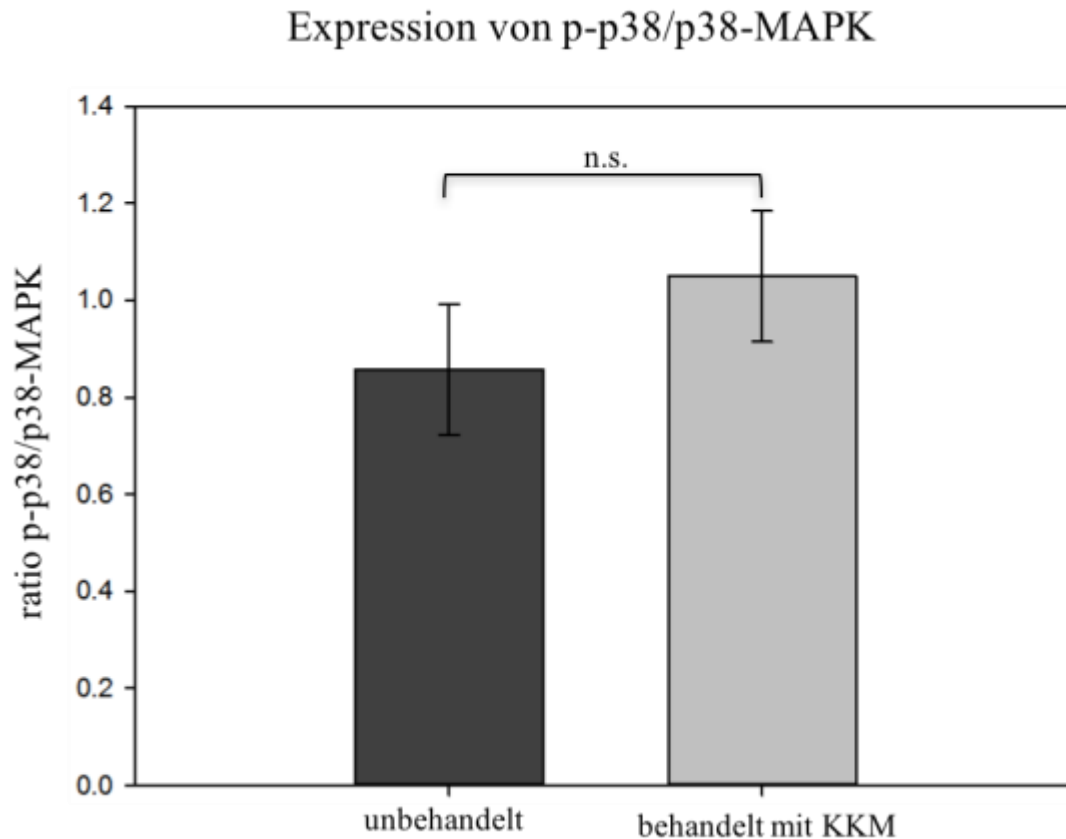


Abbildung 29: **Expression von p-p38/p38-MAPK.** Dargestellt ist die Ratio von p-p38/p38-MAPK in unbehandelten und mit KKM behandelten Kardiomyozyten.

Abschließend lässt sich zusammenfassend festhalten, dass es in der Behandlungsgruppe, in der Kardiomyozyten mit AKM behandelt wurden, signifikante Unterschiede in der Proteinexpression von β -Aktin und p-p38/p38-MAPK gibt. Im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Zellen wurden beide Proteine in dieser Behandlungsgruppe signifikant weniger exprimiert. Für die Expression von p-ERK/ERK-1/2 lässt sich sagen, dass eine statistische Tendenz ersichtlich wurde. Kardiomyozyten, die mit AKM behandelt wurden, exprimierten weniger p-ERK/ERK-1/2 im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Auf die Expression von Connexin-43 machte die Behandlung mit AKM jedoch keinen signifikanten Unterschied gegenüber unbehandelten Zellen.

Für die Behandlungsgruppe, in der Kardiomyozyten mit KKM behandelt wurden, lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Behandlung keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Kardiomyozyten hat.

Gleichwohl ist zu erkennen, dass die Expression aller Proteine tendenziell höher ist in den Kardiomyozyten, die mit KKM behandelt wurden, verglichen mit den unbehandelten Kardiomyozyten der Behandlungsgruppe.

4.6 Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstests

Um zu klären, ob die untersuchten Wachstumsfaktoren TGF- β , IGF-1 und FGFb von den Kardiomyozyten und Adipozyten aktiv sezerniert bzw. verbraucht wurden, wurde die Konzentration der entsprechenden Wachstumsfaktoren sowohl in den basalen Zellkulturmedien für Kardiomyozyten und Adipozyten, als auch in den jeweiligen konditionierten Medien bestimmt.

4.6.1 TGF- β Quantikine ELISA Kit

Für TGF- β konnte im basalen Zellkulturmedium für Kardiomyozyten eine Konzentration von $1159,72 \pm 0,02$ pg/ml und im basalen Zellkulturmedium für Adipozyten eine Konzentration von $1374,38 \pm 0,01$ pg/ml bestimmt werden. In den konditionierten Medien fiel die Konzentration von TGF- β jeweils etwas geringer aus. Sie betrug für den KKM $1068,99 \pm 0,02$ pg/ml und für den AKM $1123,13 \pm 0,01$ pg/ml (siehe Abb. 30).

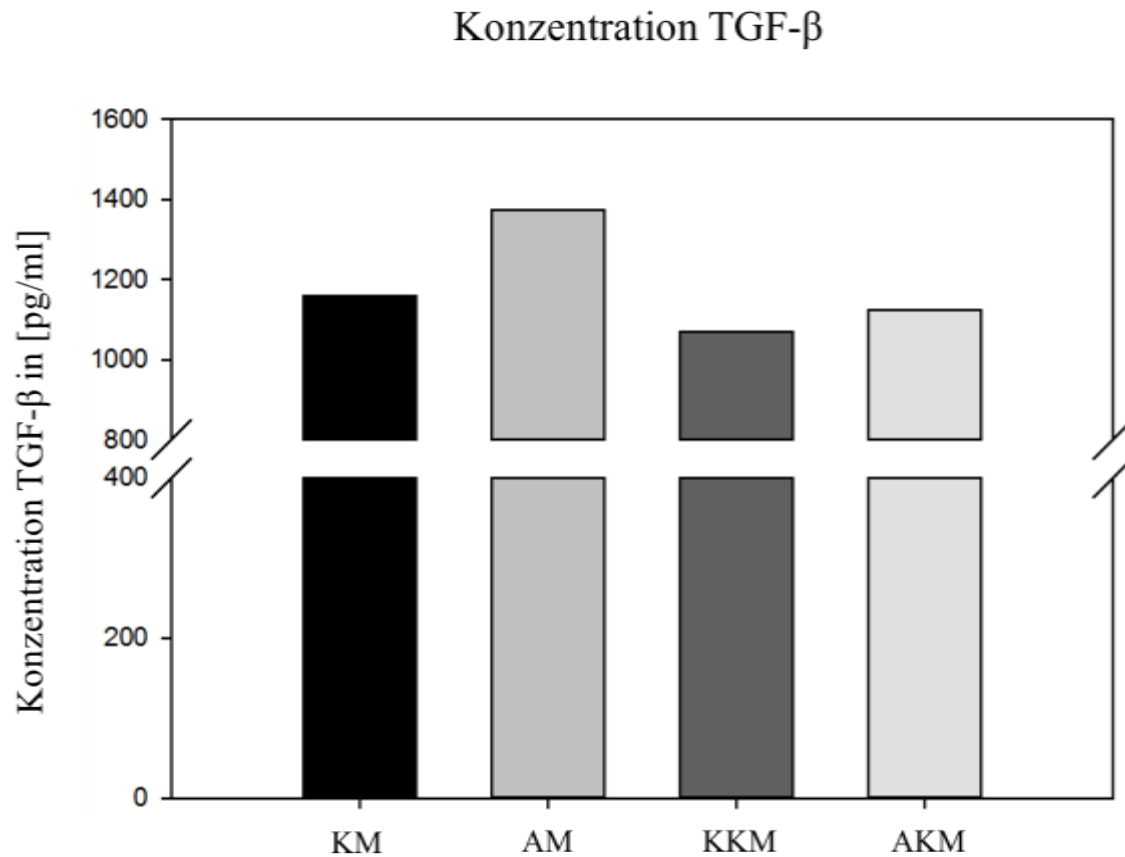


Abbildung 30: **Konzentration von TGF- β** . Dargestellt sind die photometrisch bestimmten Konzentrationen von TGF- β in den untersuchten basalen Zellkulturmedien und jeweils konditionierten Medien.

4.6.2 IGF-1 Quantikine ELISA Kit

In den basalen Zellkulturmedien für Kardiomyozyten und Adipozyten blieb die Konzentration von IGF-1 unter der im Kit angegebenen Detektionsgrenze von 3,5 pg/ml. Für das KKM konnte eine Konzentration von $187,40 \pm 0,00$ pg/ml und für das AKM konnte eine Konzentration von $343,13 \pm 0,01$ pg/ml bestimmt werden (siehe Abb. 31).

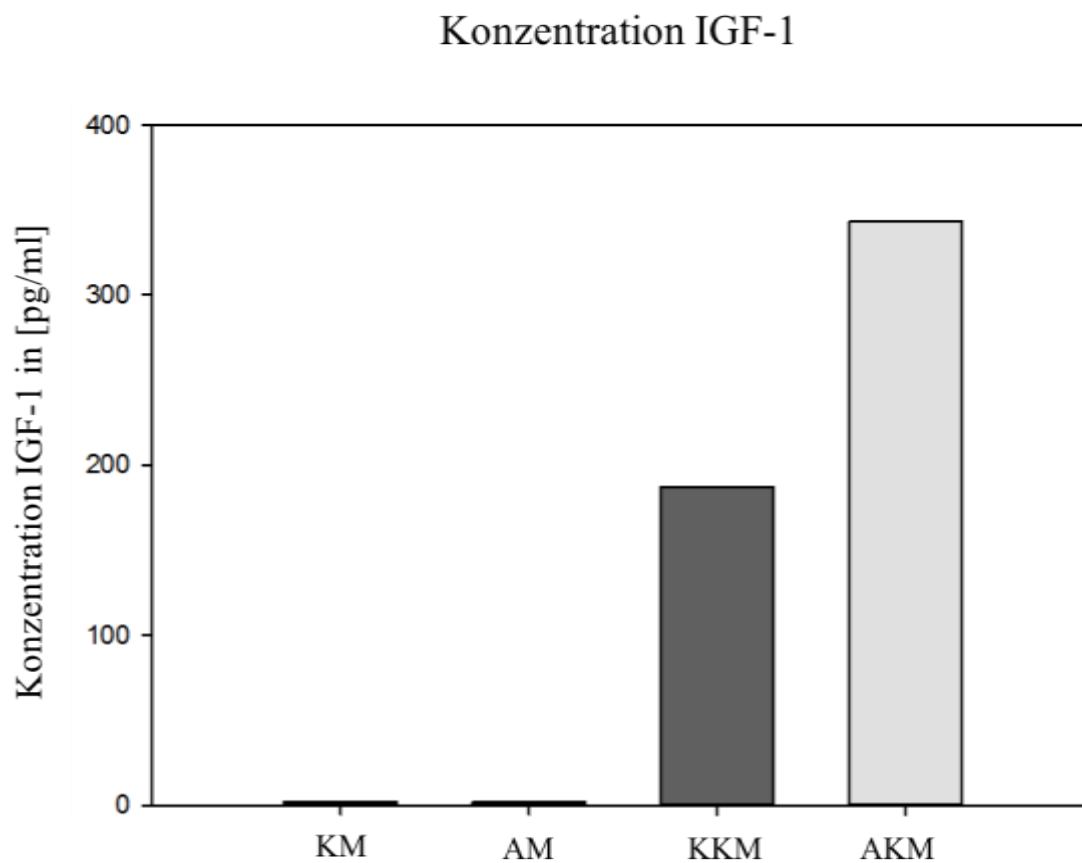


Abbildung 31: **Konzentration von IGF-1.** Dargestellt sind die photometrisch bestimmten Konzentrationen von IGF-1 in den untersuchten basalen Zellkulturmedien und den jeweils konditionierten Medien.

4.6.3 FGFb Quantikine ELISA Kit

Für das basale Kardiomyozytenzellkulturmedium blieb die Konzentration ebenfalls unter der im Kit angegebenen Detektionsgrenze von 1,42 pg/ml. Das basale Adipozytenzellkulturmedium zeigte eine Konzentration von $4,74 \pm 0,01$ pg/ml. In den konditionierten Medien konnte eine Konzentration von $5,26 \pm 0,01$ pg/ml für das KKM und eine Konzentration von $19,69 \pm 0,01$ pg/ml für das AKM bestimmt werden (siehe Abb. 32).

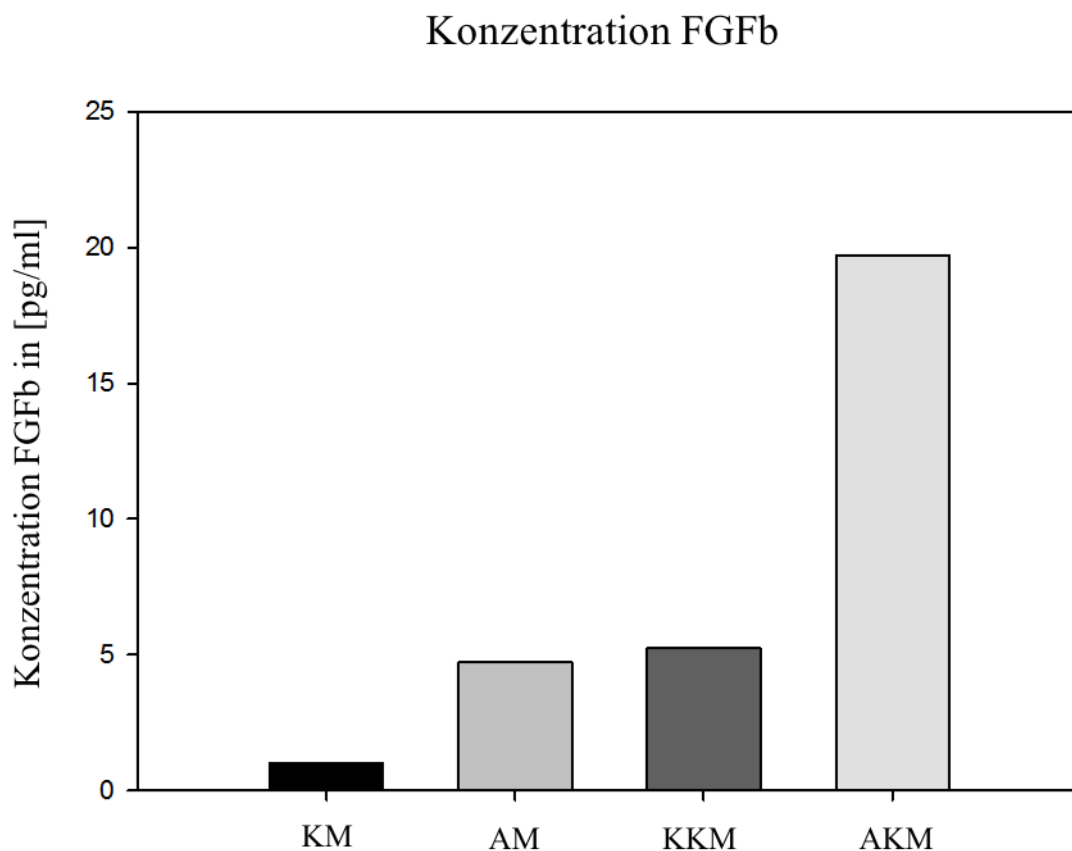


Abbildung 32: **Konzentration von FGFb.** Dargestellt sind die photometrisch bestimmten Konzentrationen von FGFb in den untersuchten basalen Zellkulturmedien und den jeweils konditionierten Medien.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die photometrisch bestimmten Konzentrationen der untersuchten Wachstumsfaktoren im basalen Zellkulturmedium für Adipozyten und dem dazugehörigen AKM stets höher waren als die Konzentrationen, die für das basale Kardiomyozytenkulturmedium und dem entsprechenden KKM bestimmt werden konnten.

5 Diskussion

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Arbeiten publiziert, die die Einflüsse einzelner Adipozytokine in Bezug auf ihre Funktionen in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen untersucht haben (Northcott et al., 2012). Hinsichtlich der Funktion und Bedeutung ganzer Adipozytokin-Profile auf die Genese kardiovaskulärer Erkrankungen ist bisher jedoch nur wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer 24 stündigen Behandlung von neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten mit einem Adipozyten-konditioniertem Zellkulturmedium in Hinblick auf Veränderungen in Hypertrophie-assoziierten Signalwegen und Zellproteinen, respektive der Schlagfrequenz, zu untersuchen.

In Zusammenschau aller Ergebnisse wird klar deutlich, dass die Behandlung von Kardiomyozyten mit einem Adipozyten-konditionierten Medium einen Einfluss auf die Proteinexpression Hypertrophie-assoziiierter Signalwege hat. Ausschlaggebend dabei ist die signifikant niedrigere Phosphorylierungsratio von p-p38/p38-MAPK und signifikant verminderte Proteinexpression von β -Aktin, sowie die verminderte Phosphorylierungsratio von p-ERK/ERK-1/2.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Zellkultur

Ein entscheidender Vorteil von primären Zellkulturen liegt insbesondere darin, dass sie, verglichen mit immortalisierten Zelllinien ihre zellspezifischen Charakteristika *in vitro* beibehalten und so den Bedingungen *in vivo* näherkommen. Zudem ist es möglich, konstante und reproduzierbare Versuchsbedingungen *in vitro* zu schaffen.

Um stets gleiche Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurde konstant darauf geachtet, dass die neonatalen Ratten nicht älter als 48 Stunden waren, Zellkulturmedien nicht älter als sechs Wochen waren und Zellkulturseren die gleiche Chargennummer aufwiesen.

Seren bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlichster Komponenten, hierzu zählen unter anderem Proteine, Lipide, Wachstumsfaktoren, Hormone und Enzyme. Es ist somit eine nicht eindeutig definierte Komponente im Zellkulturmedium und unterliegt einer hohen

Chargenvariabilität. Obwohl darauf geachtet wurde, dass die zu den Zellkulturmedien zugegebenen Seren jeweils die gleichen Chargennummern aufwiesen, lässt sich nicht sicher ausschließen, dass die Inhaltsstoffe, hier insbesondere Wachstumsfaktoren, zu einer Beeinflussung der Ergebnisse geführt haben.

Sowohl bei der Kardiomyozytenkultur, als auch bei der Adipozytenkultur handelte es sich um Mischkulturen. In der Kardiomyozytenkultur lag der Anteil an Kardiomyozyten bei 95%. Durch das 45-minütige „preplating“ und die Zugabe von Pferdeserum konnte insbesondere der Anteil an Fibroblasten geringgehalten werden. Eine gegenseitige Beeinflussung von Kardiomyozyten und Fibroblasten, wie sie physiologischer Weise auch im vitalen Myokard vorkommt, ist dennoch nicht auszuschließen.

Der Anteil an Adipozyten in der Adipozytenkultur lag am Ende der Kulturzeit bei 10%. Der Anteil an nicht-Adipozyten wurde nicht weiter differenziert. Entsprechend der Literatur ist aber davon auszugehen, dass es sich größtenteils um Präadipozyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten handelt (Hajer et al., 2008). Trotz des geringen Anteils an Adipozyten am Ende der Zellkultur wurde auf eine weitere Differenzierung der Zellen in dieser Arbeit bewusst verzichtet.

Die Entscheidung dafür begründet sich in der physiologischen Zusammensetzung des Fettgewebes (siehe Kapitel 1.2.1 und 1.2.2). Fettgewebe besteht aus allen oben genannten Zelltypen, die wiederum alle an der Sekretion von Adipozytokinen beteiligt sind. Demzufolge ist ein physiologisches Adipozyten-Sekretom auch gleichzeitig ein Spiegel aller genannten Zelltypen, bei dem auch Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zellgruppen eine Rolle spielen.

Eine kritische Betrachtungsweise in Hinblick auf die niedrige Adipozytenzellzahl und der Ergebnisse lässt jedoch auch den Schluss zu, dass es sich möglicherweise gar nicht um einen Adipozytokin-vermittelten Effekt gehandelt hat. An dieser Stelle wäre eine weitere Differenzierung der Zellen durchaus hilfreich gewesen um zu klären, ob es sich etwa um einen Fibroblasten-vermittelten Effekt gehandelt hat. Dies wäre auch in Zusammenschau mit den ermittelten FGFb-Spiegeln hilfreich gewesen.

5.1.2 Studienmodell

Das in dieser Arbeit angewendete *in vitro* Zellkulturmodell ist ein in der Literatur gut beschriebenes Modell, um die metabolischen Effekte von Adipozytokinen auf Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen zu untersuchen (Palanivel, Vu, Park, Fang, & Sweeney, 2008; Vu et al., 2007).

Der Einfluss vieler einzelner Adipozytokine auf die Biologie von Kardiomyozyten konnte in der Literatur vielfach beschrieben werden (Northcott et al., 2012).

Ein wesentlicher Vorteil dieses Modells ist jedoch, dass es den ausgeprägten „crosstalk“ der verschiedenen Adipozytokine bezüglich ihrer Signalwege und biologischen Wirkungen, sowie deren gegenseitige Beeinflussung *in vivo* berücksichtigt. So ist es möglich, die biologischen Effekte verschiedener Adipozytokin-Profile *in vitro* zu studieren.

Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist, dass eine zusätzliche Beeinflussung, zum Beispiel durch neuronale Stimuli, minimiert wird.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Deaktivierung von p-p38/p38-MAPK und p-ERK/ERK-1/2

Die obligate Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen in der Pathogenese kardialer Hypertrophie konnte eindeutig belegt werden (Bueno et al., 2001).

Bezüglich der Rolle von Adipozytokinen in der Vermittlung kardialer Hypertrophie konnten bislang mehrere Arbeiten eindeutig zeigen, dass insbesondere Leptin (Madani, De Girolamo, Muñoz, Li, & Sweeney, 2006; Rajapurohitam, Gan, Kirshenbaum, & Karmazyn, 2003) und Resistin (Kang, Chemaly, Hajjar, & Lebeche, 2011; M. Kim et al., 2008) von entscheidender Bedeutung sind. Leptin vermag dies durch eine direkte Induktion der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen zu realisieren. Resistin wirkt hingegen über eine Inhibition der AMP-Kinase, wodurch eine durch die AMP-Kinase vermittelte Inhibition von ERK-1/2 ausbleibt.

Aus der Familie der Wachstumsfaktoren sind insbesondere die in dieser Arbeit untersuchten Vertreter TGF- β , FGFb und IGF-1 fähig, eine kardiale Hypertrophie durch Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, hier im besonderen ERK-1/2 und p38-MAPK, zu induzieren (Dobaczewski, Chen, & Frangogiannis, 2011; Foncea et al., 1997; Kardami et al., 2004).

Im Gegensatz dazu konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass insbesondere Adiponektin in der Lage ist über eine Phosphorylierung und schließlich Aktivierung der AMP-Kinase einer Induktion von ERK-1/2 entgegenzuwirken (Li et al., 2016; Shibata et al., 2004).

Zusammengefasst untermauern diese Tatsachen erneut die als kardio-schädigend beschriebenen Einflüsse von Leptin und Resistin und stärken ebenso die als kardio-protektiven dokumentierten Eigenschaften von Adiponektin (siehe Kapitel 1.2.4 und 1.2.5) in der Regulation des kardialen Remodelings im Gesunden und bei Übergewicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach der Behandlung von Kardiomyozyten mit einem Adipozyten-konditionierten Medium zu einer verminderten Phosphorylierung von p38-MAPK und ERK-1/2 gekommen ist. Dieser Effekt konnte trotz erhöhter Konzentrationen an Hypertrophie-induzierenden Wachstumsfaktoren im Adipozyten-konditionierten Medium gezeigt werden.

Zusammengefasst bedeutet dies also, dass trotz des erhöhten Angebots an Hypertrophie-induzierenden Wachstumsfaktoren nicht die zu erwartende Zellantwort in Form einer zellulären Hypertrophie eingetreten ist.

Das Ergebnis steht somit im klaren Gegensatz zu den Studien von Dobaczewski et al., Foncea et al. und Kardami et al. und lässt hier vielmehr auf einen anti-hypertrophen Effekt schließen (Dobaczewski et al., 2011; Foncea et al., 1997; Kardami et al., 2004).

Bairwa et al. konnte Anfang des Jahres ebenfalls erstmalig einen anti-hypertrophen Effekt auf Kardiomyozyten nach der Behandlung mit einem Adipozyten-konditionierten Medium publizieren (Bairwa et al., 2016).

Für die Gewinnung des Fettgewebes nutzten sie ebenfalls adulte Sprague-Dawley Ratten. Als Kontrolle verwendeten sie Fettgewebe von JCR:LA-cp Ratten, die sich durch Übergewicht, Insulinresistenz und Hypertriglyzeridämie auszeichneten.

Bei ihren experimentellen Arbeiten konnten sie eine mittels Endothelin-1 induzierte zelluläre Hypertrophie durch die Behandlung mit dem Adipozyten-konditionierten Medium der normalen Sprague-Dawley Ratten konzentrationsabhängig antagonisieren. Dieser anti-hypertrophe Effekt konnte nach Behandlung mit dem Adipozyten-konditionierten Medium der JCR:LA-cp Ratten nicht bestätigt werden.

Der anti-hypertrophe Effekt wurde durch die Verwendung eines Leptin-Rezeptorantagonist verstärkt und durch die Verwendung eines Adiponektin-Rezeptorantagonist abgeschwächt. Eine Analyse der im Medium befindlichen Adipozytokine konnte keine signifikanten Unterschiede in der Vielzahl der Untersuchten Adipozytokine widerspiegeln. Auffällig waren nur die Veränderungen bezüglich der Leptin- und Adiponektin-Spiegel. Erwartungsgemäß zeichnete sich das Medium der normalen Sprague-Dawley Ratten durch hohe Adiponektin- und niedrige Leptin-Spiegel aus. Im Medium der JCR:LA-cp Ratten verhielt es sich genau umgekehrt. Es resultierte eine 11-mal höhere Leptin zu Adiponektin Ratio im Adipozyten-konditionierten Medium der JCR:LA-cp Ratten.

Weiterhin untersuchten die Autoren die Expressionsniveaus der AMP-Kinase und der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen. Es stellte sich heraus, dass der anti-hypertrophe Effekt mit einer zunehmenden Phosphorylierung der AMP-Kinase assoziiert ist. Bezüglich der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen konnten sie keine Veränderungen feststellen.

Die Autoren schlussfolgerten, dass der anti-hypertrophe Effekt vorrangig durch die Adiponektin vermittelte Induktion der AMP-Kinase realisiert wird. Zudem gehen sie davon aus, dass die Leptin/Adiponektin-Balance die ausschlaggebende Kraft hinter der Wirkung eines Adipozyten-konditionierten Mediums ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen ebenfalls vermuten, dass die Deaktivierung von p38-MAPK und ERK-1/2 Adipozytokin-vermittelt ist. Da für die Behandlung ein physiologisches Adipozytokinprofil verwendet wurde, könnte ebenfalls eine niedrige Leptin/Adiponektin Ratio für die Deaktivierung von p38-MAPK und ERK-1/2 verantwortlich gewesen sein. Bairwa et. al. konnte jedoch keine Veränderungen in der Expression der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen in seinen Untersuchungen feststellen. Dabei ist zu beachten, dass insbesondere die Leptin-abhängige Induktion von p-ERK/ERK-1/2 und p-p38/p38-MAPK zeitabhängig ist. Rajapurohitam et al. konnten in ihrer Arbeit eine initial signifikant erhöhte Phosphorylierungsratio von p-ERK/ERK-1/2 und p-p38/p38-MAPK nach fünf bis zehn Minuten zeigen, die im Verlauf wieder zu den basalen Ausgangswerten zurückkehrte (Rajapurohitam et al., 2003). Es ist also vorstellbar, dass es in der vorliegenden Arbeit zu einer initialen Induktion der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen gekommen ist, die nach 24 Stunden Inkubationszeit jedoch unter das basale Expressionsniveau gefallen ist. Zudem zählt p38-MAPK zu den Stress-aktivierten Proteinkinasen. Neben der Signaltransduktion hypertropher Stimuli werden auch zelluläre Stressfaktoren mit ihrer

Aktivierung assoziiert (siehe Kapitel 1.3.1.2). Die signifikant verminderte Phosphorylierung von p38-MAPK könnte somit auch Ausdruck fehlender zellulärer Stressfaktoren sein.

Das Ergebnis steht somit im Einklang mit den umfangreich beschriebenen kardio-protectiven Eigenschaften von Adiponektin (Ebrahimi-Mamaeghani, Mohammadi, Arefhosseini, Fallah, & Bazi, 2015; Ghantous, Azrak, Hanache, Abou-Kheir, & Zeidan, 2015).

In der Behandlungsgruppe, in der Kardiomyozyten mit dem Kardiomyozyten-konditioniertem Zellkulturmedium behandelt wurden konnten keine signifikanten Veränderungen in der Expression der untersuchten Proteine festgestellt werden. Gleichwohl waren die Expressionsniveaus der Proteine bei niedrigeren Spiegeln an TGF- β , FGFb und IGF-1, verglichen mit den Spiegeln im Adipozyten-konditioniertem Zellkulturmedium höher als bei den jeweils unbehandelten Zellen, die nur mit dem regulären Folgemedium behandelt wurden. Auch wenn diese Ergebnisse nicht signifikant sind, deuten sie dennoch auf eine Wachstumsfaktor-abhängige Phosphorylierung von p-ERK/ERK-1/2 und p-p38/p38-MAPK hin und stehen so im Einklang mit den Studien von Dobaczewski et al., Foncea et al. und Kardami et al. (Dobaczewski et al., 2011; Foncea et al., 1997; Kardami et al., 2004).

5.2.2 Connexin-43 und β -Aktin

Für die Regulation der Connexin-43 Expression im Myokard spielen sowohl α -, als auch β -adrenerge Rezeptoren eine wesentliche Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von neonatalen Kardiomyozyten der Ratte mit Agonisten an α - und β -adrenergen Rezeptoren (z.B. Noradrenalin, Phenylephrine und Isoproterenol) zu einer signifikant gesteigerten Connexin-43-mRNA und Connexin-43 Proteinexpression führten (Salameh et al., 2006). Verantwortlich dafür ist die Stimulation und Aktivierung der adrenergen Rezeptoren. Diese gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und führen „downstream“ zu einer Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, hier insbesondere ERK-1/2 und p38-MAPK (Salameh & Dhein, 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit den beiden Hypertrophie-induzierenden Stimuli Endothelin-I und Angiotensin-II, ebenfalls Agonisten an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, zu einer verstärkten Expression von Connexin-43 führte. Dieser Effekt wurde ebenfalls durch die Aktivierung der beiden Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK-1/2 und p38-MAPK realisiert (Polontchouk, Ebelt, Jackels, & Dhein, 2002). Mitogen-aktivierte Proteinkinasen spielen eine obligate Rolle in der Vermittlung kardialer Hypertrophie. Folglich konnte

ebenfalls gezeigt werden, dass kardiale Hypertrophie mit einer gesteigerten Expression von Connexin-43 einhergeht (Kostin et al., 2004; Salameh et al., 2006). Somit eignet sich die Bestimmung von Connexin-43 als Markerprotein für kardiale Hypertrophie. Zusammenfassend stellt sich eine wesentliche Beteiligung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen in der Regulation von Connexin-43 heraus.

Auch die Bedeutung des zytoskelettalen Proteins β -Aktin als Markerprotein für zelluläre Hypertrophie konnte gezeigt werden. Balasubramanian et al. konnte eine erhöhte Expression von β -Aktin als Folge einer induzierten Hypertrophie nachweisen (Balasubramanian, Mani, Kasiganesan, Baicu, & Kuppaswamy, 2010). Zudem konnten Rojas Gomez et al. eine adrenerg-induzierte Proteinexpression von β -Aktin unabhängig der Proteinexpression von Connexin-43 zeigen. Hintergrund dieser Tatsache ist die Stimulation liganden-spezifischer Subtypen adrenerger Rezeptoren und deren nachgeschalteter Signalkaskaden (Rojas Gomez, Schulte, Mohr, & Dhein, 2008). Eine hohe Connexin-43-Expression als Folge einer induzierten Hypertrophie muss demnach nicht mit einem hohen Expressionsniveau an β -Aktin einhergehen. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in dieser Arbeit dargestellt werden.

In der Behandlungsgruppe, in der Kardiomyozyten mit einem Adipozyten-konditioniertem Medium behandelt wurden, zeigte sich eine Connexin-43 unabhängige Expression von β -Aktin. Bei einer signifikant verminderten Expression von β -Aktin, konnte keine Veränderung in der Expression von Connexin-43 ermittelt werden.

Sowohl β -Aktin, als auch Connexin-43 dienten in dieser Studie als Marker für zelluläre Hypertrophie. Die signifikant verminderte Expression von β -Aktin steht somit im Einklang mit den Phosphorylierungsratios von p-p38/p38-MAPK und p-ERK/ERK-1/2 und unterstreicht erneut den anti-hypertrophen Effekt und das dahinter vermutete physiologische Adipozytokinprofil.

Die unveränderte Expression von Connexin-43 steht dagegen nur eingeschränkt im Einklang mit den anderen Ergebnissen. Einem Modell von Seidel et al. zufolge besitzen hypertrophe Kardiomyozyten eine größere Zellmembran und haben eine höhere Zellkapazität. Um eine adäquate Weiterleitung von Aktionspotentialen zwischen den Zellen zu gewährleisten, muss demzufolge die Dichte an Connexinen in hypertrophen Zellen zunehmen (Seidel, Salameh, & Dhein, 2010). In der vorliegenden Studie ist die Connexin-43 Expression jedoch unbeeinflusst. Theoretisch müsste bei verminderter β -Aktin Expression als Ausdruck eines anti-hypertrophen Effekts auch die Expression von Connexin-43 vermindert sein. Zudem ist die Connexin-43 Expression abhängig von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen.

Eine Deaktivierung von p-p38/p38-MAPK und p-ERK/ERK-1/2 müsste ebenfalls eine verminderte Proteinexpression von Connexin-43 als zu erwartende Folge haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die Expression von β -Aktin im Zusammenhang mit der Phosphorylierungsratio von p-ERK/ERK-1/2 und p-p38/p38-MAPK steht.

Im Gegensatz dazu scheint die Expression von Connexin-43 in dieser Studie unabhängig von den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen zu sein. Möglicherweise sind an dieser Stelle andere Signalwege in der gemeinsamen Regulation von Connexin-43 und β -Aktin beteiligt. Ein möglicher und in dieser Studie sehr wahrscheinliche Erklärungsansatz bietet die oben beschriebene Connexin-43 unabhängige Expression von β -Aktin. Des Weiteren wurde bei den biochemischen Western-Blot Untersuchungen der gesamte Anteil an Connexin-43 bestimmt. Connexin-43 findet sich im Myokard jedoch nicht ausschließlich an den Zellpolen der Kardiomyozyten, weitere Anteile können ebenfalls perinukleär in Assoziation mit dem endoplasmatischen Retikulum ausgemacht werden (Duffy et al., 2006). Gesteigerte Anteile an perinukleärem Connexin-43 können so das Ergebnis beeinflussen. Zudem scheint es Unterschiede in den jeweiligen Promotorsequenzen und Transkriptionsfaktoren zu geben, die ebenfalls eine unabhängige Regulation der beiden Proteine nahelegen (Quitschke, Lin, DePonti-Zilli, & Paterson, 1989; Salameh & Dhein, 2011; Teunissen & Bierhuizen, 2004).

In der Behandlungsgruppe, in der die Kardiomyozyten mit dem Kardiomyozyten-konditioniertem-Medium behandelt wurden, konnten keine signifikanten Veränderungen in der Expression von Connexin-43 und β -Aktin festgestellt werden. Gleichwohl waren die Expressionsniveaus höher, analog zu den Expressionsniveaus von p-ERK/ERK-1/2 und p-p38/p38-MAPK. Dies könnte wiederum Ausdruck einer Wachstumsfaktor-induzierten zellulären Hypertrophie durch nachgeschaltete Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen sein.

5.2.3 Spiegelanalysen der Wachstumsfaktoren TGF- β , FGFb und IGF-1

TGF- β gehört zu der Gruppe der Transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF, transforming growth factor) und ist ein pleiotropes und multifunktionelles Zytokin mit einer Vielzahl zellspezifischer biologischer Funktionen. Dazu zählen unter anderem Funktionen in Hinblick auf Embryonalentwicklung, Zellwachstum, Zellproliferation und Zellüberleben. Bezüglich der Bedeutung von TGF- β konnte im Tiermodell ein klarer Zusammenhang zwischen Herzversagen, Herzhypertrophie und Fibrose und der Überexpression von TGF- β beobachtet werden. TGF- β vermittelt seine Effekte dabei unter anderem über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (Dobaczewski et al., 2011). Zudem wird TGF- β von einigen Autoren zu den Adipozytokinen gezählt (Bays et al., 2008; Fasshauer & Blüher, 2015).

FGFb, auch FGF-2 oder basic-FGF bezeichnet, zählt zu der großen Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF, fibroblast growth factor) und hat ähnlich vielfältige biologische Funktionen wie TGF- β . Hierzu zählen zum Beispiel Aufgaben in der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zellüberleben. Auch die Bedeutung von FGFb in Zusammenhang mit einem pathologischen kardialen Remodeling und Herzhypertrophie konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden. Dabei vermittelt auch FGFb seine biologischen Funktionen über eine Induktion von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (Itoh & Ohta, 2013; Kardami et al., 2004).

IGF-1 gehört zu der Gruppe der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF, insulin-like growth factor). Unter den Wachstumsfaktoren ist IGF-1 gleichermaßen bekannt dafür, eine kardiale Hypertrophie durch Zellwachstum und Zelldifferenzierung zu induzieren (Foncea et al., 1997). Dabei sind ebenfalls Mitogen-aktivierende Proteinkinasen involviert (Abbas, Grant, & Kearney, 2008). Zudem wird IGF-1 in der Literatur zu den Adipozytokinen gezählt (Ronti, Lupattelli, & Mannarino, 2006).

Abschließend lässt sich also festhalten, dass die Potenz der untersuchten Wachstumsfaktoren bezüglich einer Induktion einer kardialen Hypertrophie durch Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen in vielen Arbeiten gezeigt werden konnte.

Hinsichtlich der gemessenen Spiegel an TGF- β wird deutlich, dass sowohl Kardiomyozyten, als auch Adipozyten TGF- β verbrauchen. Dies wird durch die jeweils erniedrigten Spiegel in den jeweiligen Zellkulturüberständen, verglichen mit den gemessenen Spiegeln im basalen Zellkulturmedium, deutlich. Die gewissermaßen hohen Spiegel an TGF- β in den basalen Zellkulturmedien sind nur durch den Zusatz der verwendeten Seren zu erklären. Das Zellkulturmedium für die Kardiomyozyten enthält dabei 10% Pferdeserum (HS, horse serum)

und 1% fetales Kälberserum (FKS, fetales Kälberserum). Das Zellkulturmedium für die Adipozyten enthält nur 10% FKS.

Bezogen auf die ermittelten Spiegel an FGFb lässt sich sagen, dass die Grundspiegel in den jeweiligen Zellkulturmedien wiederum serumabhängig sind, wobei der Spiegel an FGFb im Zellkulturmedium für Adipozyten analog dem gemessenen Wert für TGF- β höher ist. Die Werte aus den jeweiligen Zellkulturüberständen deuten daraufhin, dass FGFb von beiden Zelltypen sezerniert wird. Die Adipozytenkultur sezerniert dabei mehr FGFb als die Kardiomyozytenkultur.

IGF-1 konnte weder im basalen Zellkulturmedium für Kardiomyozyten, noch im basalen Zellkulturmedium für Adipozyten nachgewiesen werden. Die ermittelten Werte in den jeweiligen Zellkulturüberständen lassen jedoch den Schluss zu, dass beide Zelltypen IGF-1 in das Medium sezernierten. Adipozyten sezernieren dabei mehr IGF-1 als Kardiomyozyten. Dies erscheint logisch, da IGF-1 zu den Adipozytokinen gezählt wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die ermittelten Spiegel der untersuchten Wachstumsfaktoren in dem Adipozyten-konditionierten Medium stets höher waren als die Spiegel, die für das Kardiomyozyten-konditionierte Medium ermittelt werden konnten.

Einschränkend muss man jedoch erneut sagen, dass es sich bei beiden Zellkulturen um Mischkulturen gehandelt hat. Gerade die erhöhten Spiegel an FGFb in den konditionierten Medien könnten also auch Ausdruck der Mischkulturen mit jeweils erhöhten Anteilen an Fibroblasten sein.

In der Behandlungsgruppe, in der Kardiomyozyten mit dem Adipozyten-konditionierten Medium behandelt wurden, bleibt die Induktion der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen als adäquate zelluläre Response aus. Entgegen der zu erwartenden Phosphorylierung kommt es zu einer verminderten Phosphorylierungsratio von p-ERK/ERK-1/2 und p-p38/p38-MAPK.

Ein möglicher Erklärungsansatz bietet hier eine zeitabhängige Induktion der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen. Clerk et al. konnten für IGF-1 eine zeitabhängige Induktion von p-ERK/ERK-1/2 zeigen. Demnach war die Expression initial nach drei bis fünf Minuten maximal erhöht und kehrte nach 30 Minuten zu Ausgangswerten zurück (Clerk, Aggeli, Stathopoulou, & Sugden, 2006). Foncea et al. konnten eine ähnliche zeitabhängige Induktion von p-ERK/ERK-1/2 mit maximalen Expressionsniveaus nach fünf Minuten und einer Rückkehr zu Ausgangswerten nach 30 Minuten zeigen (Foncea et al., 1997).

Für FGF konnte ein ähnlicher Effekt beschrieben werden. Bogoyevitch et al. konnten eine initiale Induktion von p-ERK/ERK-1/2 nach fünf Minuten mit einem anschließenden Rückgang zu Ausgangswerten nach 60-120 Minuten zeigen (Bogoyevitch et al., 1994).

Bei den oben erwähnten Arbeiten muss allerdings beachtet werden, dass die Autoren für ihre Untersuchungen andere Zellkulturbedingungen gewählt haben. Bevor die Kardiomyozyten mit den jeweiligen Wachstumsfaktoren behandelt wurden, wurden die Zellen für 24 Stunden mit einem serumfreien Zellkulturmedium behandelt. Serumfreie Zellkulturmedien beinhalten dabei gewöhnlicherweise keine Wachstumsfaktoren. Die initial erhöhten Phosphorylierungsgrade könnten also auch Ausdruck der zuvor serumfreien Behandlung sein. Die Zellen werden nach einer 24 stündigen Wachstumsfaktor-Karenz erneut den Wachstumsfaktoren ausgesetzt, was zu einer initialen Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen führt. Nach einer gewissen Gewöhnungsphase kehrt diese wieder zu Ausgangswerten zurück. In der vorliegenden Studie wurde auf serumfreie Zellkulturmedien verzichtet um keine nicht-physiologischen Bedingungen zu schaffen. Die stetige Präsenz von Wachstumsfaktoren könnte somit zu einer gewissen Gewöhnung geführt haben, so dass eine Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ausblieb.

Ein weiterer Erklärungsansatz bietet eine schlichtweg zu geringe Konzentration an entsprechenden Wachstumsfaktoren in den konditionierten Medien. In dieser Studie wurden Konzentrationen im Bereich von pg/ml gemessen. Die oben genannten Autoren verwendeten für ihre Experimente Konzentrationen im Bereich von ng/ml. Des Weiteren könnten wiederum andere Adipozytokine für die Kompensation einer Wachstumsfaktor-induzierten Hypertrophie verantwortlich sein. Hier insbesondere wieder Adiponektin mit den bereits beschriebenen Funktionen und Signalmechanismen.

In der anderen Behandlungsgruppe, in der die Kardiomyozyten mit dem Kardiomyozyten-konditionierten Medium behandelt wurden, lässt sich durchaus die zu erwartende Zellantwort erkennen. Wenn auch nicht signifikant, sind die Expressionsniveaus von p-ERK/ERK-1/2 und p-p38/p38-MAPK höher im Vergleich zu den Zellen, die nicht behandelt wurden. Da eine zeitabhängige Induktion von p-ERK/ERK-1/2 für Konzentrationen im Bereich von ng/ml beschrieben ist, ist eine zeitunabhängige Induktion für Konzentrationen im Bereich von pg/ml durchaus vorstellbar.

5.2.4 Schlagfrequenzen

Wie in Kapitel 1.1.1 bereits beschrieben, ist Übergewicht ein wesentlicher Risikofaktor in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. Hinsichtlich Herzrhythmusstörungen wurde insbesondere die Assoziation von Übergewicht und dem Auftreten von Vorhofflimmern beschrieben (Rothe et al., 2014).

Bezüglich der Schlagfrequenzen konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied nach der 24-stündigen Behandlung in beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden. Dies bedeutet, dass weder die bestimmten Wachstumsfaktoren, noch die vermuteten Adipozytokine modulierend auf die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten gewirkt haben.

Interessanterweise konnte jedoch in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass aus der Gruppe der Adipozytokine wieder insbesondere Leptin und Resistin in der Lage sind, die Kontraktilität von Kardiomyozyten zu beeinflussen (M. Kim et al., 2008; Y. K. Lin, Chen, Chen, Chen, & Chen, 2012; Y.-K. Lin et al., 2013; Nickola et al., 2000).

Hierbei sollte jedoch wiederum kritisch angemerkt werden, dass Kontraktilität nicht mit der Schlagfrequenz gleichzusetzen ist, Kontraktilität und Schlagfrequenz sich jedoch gegenseitig beeinflussen. Findet also keine physiologische Kontraktion statt, kann auch keine Schlagfrequenz in Herzmuskelzellen beobachtet werden. Andersherum steigt die Schlagfrequenz, wenn die Geschwindigkeit der Kontraktionen zunimmt.

Die Ergebnisse lassen also erneut den Schluss zu, dass im Adipozyten-konditioniertem Medium eine niedrige Leptin/Adiponektin Ratio zu bestimmen ist. Über den spezifischen und selektiven Einfluss anderer Adipozytokine auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten ist in der Literatur bisher leider nur wenig bekannt.

Die ermittelten Unterschiede in der Schlagfrequenz gemessen nach 48 und nach 72 Stunden, jeweils ohne Behandlung, gehen sehr wahrscheinlich auf individuelle Präparationsbedingungen zurück.

5.3 Apoptose als mögliche Ursache des anti-hypertrophen Effekts?

Die Tatsache, dass es trotz eines erhöhten Angebots an Wachstumsfaktoren zu einem anti-hypertrophen Effekt in der Behandlungsgruppe gekommen ist, in der Kardiomyozyten mit einem Adipozyten-konditioniertem Medium behandelt wurden, lässt den Verdacht aufkommen, dass die in Zellkultur befindlichen Zellen womöglich abgestorben sind.

Zelltod wird dabei im Allgemeinen in Apoptose, Nekrose und Autophagie unterteilt, einer Einteilung, die allein auf morphologischen Aspekten beruht (Takemura, Kanoh, Minatoguchi, & Fujiwara, 2013). Die morphologischen Kennzeichen von Apoptose sind dabei unter anderem Pyknose, Zellvolumenreduktion, Chromatinkondensation, Karyorrhexis und letzten Endes Zellfragmentation. Sowohl externe, als auch interne Stimuli können eine Apoptose auslösen (Takemura et al., 2013).

Abgesehen von den morphologischen Veränderungen, von denen keine während der Mikroskopie der Zellen gesehen wurden, sprechen vor allem die ermittelten Schlagfrequenzen für das Vorliegen vitaler, nicht-apoptotischer Zellen. Aus diesem Grund wurde auf die Durchführung eines Apoptose-Assays verzichtet.

Zudem erscheint es nicht logisch, dass die Expression von Connexin-43 offenbar unbeeinflusst zu sein scheint. Hätten sich die Zellen in Apoptose befunden, hätte sich auch das Expressionsniveau von Connexin-43 vermindern müssen.

Neben der Funktion von p38-MAPK in der Vermittlung kardialer Hypertrophie, konnte zudem von mehreren Autoren eine Beziehung zu Apoptose beschrieben werden. Yokota et al. haben eine chronische p-38-MAPK-Aktivität als pathologisch und pro-apoptotisch beschrieben (Yokota & Wang, 2016). Liang et al. konnten ebenfalls herausarbeiten, dass eine Aktivierung von p38-MAPK mit einer erhöhten Neigung zu Apoptose assoziiert ist (Liang & Molkentin, 2003). Auch Wang et al. konnten eine signifikante Rolle von p38-MAPK in der Pathogenese von kardialer Hypertrophie und Apoptose im Zusammenhang mit der Pathophysiologie des Herzversagens beschreiben (Wang et al., 1998).

In dieser Studie war die Expression von p-p38/p38-MAPK signifikant niedriger in der Behandlungsgruppe, in der Kardiomyozyten mit einem Adipozyten-konditioniertem Medium behandelt wurden und steht somit nicht in Einklang mit den oben erwähnten Studien. Apoptose als Grund der verminderten Proteinexpressionen in dieser Behandlungsgruppe scheint also in Zusammenschau der Ergebnisse und der Literatur keine schlüssige Erklärung zu sein.

5.4 Vermutetes Adipozytokinprofil

Wie der Studie von Bairwa et al. zu entnehmen ist, scheint die zu erwartende Wirkung eines Adipozytokin-Profiles nur von der jeweiligen Leptin/Adiponektin-Ratio abzuhängen.

Diese Ratio kann wiederum als Spiegel verwendet werden, um den Funktionszustand des Fettgewebes einzuschätzen. Gesundes, funktionales Fettgewebe besitzt hohe Adiponektin- und niedrige Leptin-Spiegel, wohingegen es sich in dysfunktionalem Fettgewebe entgegengesetzt verhält (siehe Kapitel 1.2.3).

Eine große prospektive Studie aus den Niederlanden konnte zeigen, dass die Adiponektin/Leptin-Ratio ein zuverlässigerer Prädiktor für die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen ist, als alleinige Adiponektin- oder Leptinspiegel (Kappelle, Dullaart, van Beek, Hillege, & Wolffenbuttel, 2012). In einer weiteren Arbeit konnte ebenfalls beschrieben werden, dass die Adiponektin/Leptin-Ratio ein deutlich besserer Prädiktor für metabolische und klinische Parameter ist als Adiponektin und Leptin allein. Es konnte gezeigt werden, dass die Adiponektin/Leptin-Ratio signifikant mit dem BMI, dem systolischen Blutdruck und der Dicke der Arteria carotis communis korreliert, wohingegen Adiponektin und Leptin jeweils einzeln nur eingeschränkt als mögliche Prädiktoren dienen. Die Dicke der Arteria carotis communis diente in dieser Studie als Parameter für arteriosklerotischer Veränderungen bei Gesunden und Patienten mit metabolischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus (Norata et al., 2007).

Dhein hingegen vermutet, dass die Wirkung eines Adipozytokin-Profiles von mehreren Faktoren abhängig ist. Viszerale, subkutane und abdominale Fettgewebe kann über endokrine Mechanismen die Biologie von Kardiomyozyten beeinflussen, wohingegen epikardiales Fettgewebe in der Lage ist, dies durch die unmittelbare Nähe zu Kardiomyozyten via parakriner Mechanismen umzusetzen. Hinzu kommen jedoch auch hier die beschriebenen Unterschiede im Sekretom der Zellen, die vom jeweiligen Funktionszustand der Zellen, von der zellulären Zusammensetzung des Fettgewebes und von der Lokalisation des Fettgewebes abhängig sind (Dhein, 2014).

Dabei steht neben viszeralem und abdominalem Fettgewebe auch zunehmend epikardiales und perivaskuläres Fettgewebe im Fokus aktueller Untersuchungen bezüglich der Frage, welchen pathophysiologischen Veränderungen das epikardiale und perivaskuläre Fettgewebe bei Übergewicht ausgesetzt ist und welchen Einfluss dies auf die kardiovaskuläre Funktion hat (Hatem & Sanders, 2014; Iacobellis, 2014; Ouwens, Sell, Greulich, & Eckel, 2010; Sacks & Fain, 2007). Hintergrund dafür ist zum einen eine bekannte positive Korrelation von

viszeraler Adipositas und der Dicke des epikardialen Fettgewebes und zum anderen die Tatsache, dass es bislang keine starke Evidenz dafür gibt, dass epikardiales oder perivaskuläres Fettgewebe allein und unabhängig das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöht. Die Assoziation von vermehrtem epikardialen Fettgewebe und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse beruht dabei eher auf der konsekutiven Vermehrung von viszeralem Fettgewebe (Fitzgibbons & Czech, 2014)

Es scheint also auch nötig zu sein, eine gewisse Differenzierung bezüglich Ursprung des Fettgewebes, Funktionszustand und Sekretom des Fettgewebes und Wirkmechanismus der Adipozytokine vorzunehmen.

Über die genaue Zusammensetzung des Adipozyten-konditionierten Mediums in der vorliegenden Arbeit lässt sich nur spekulieren. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob und inwiefern die Behandlung mit einem physiologischen Adipozytokinprofil einen Effekt auf Hypertrophie assoziierte Signalwege und Zellproteine in Kardiomyozyten hat. Hinsichtlich der Vielzahl an möglichen Adipozytokinen wurde aus diesem Grund auf die Bestimmung einzelner Adipozytokine verzichtet (siehe Kapitel 1.2.2).

Es erscheint jedoch gut vorstellbar, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine niedrige Leptin/Adiponektin-Ratio mit niedrigen Leptin- und hohen Adiponektin-Spiegeln zurückzuführen sind. Dies steht wiederum im guten Einklang mit Bairwa et al. und damit, dass für Gewinnung des Adipozyten-konditionierte Mediums Adipozyten von normalgewichtigen und gesunden Sprague-Dawley Ratten verwendet wurden.

5.5 Limitationen

Die wahrscheinlich größte Limitation dieser Arbeit besteht womöglich darin, dass letztendlich unklar bleibt, welche Adipozytokine für den gezeigten anti-hypertrophen Effekt verantwortlich sind. Beleuchtet man die Ergebnisse jedoch im Zusammenhang mit der bisher publizierten Literatur, wird ersichtlich, dass es sich höchstwahrscheinlich nur um Adiponektin als führendes Adipozytokin im Adipozyten-konditionierten Medium handeln kann (Bairwa et al., 2016). Wie bereits erwähnt, lag der Fokus der vorliegenden Arbeit nicht darauf, spezifische Adipozytokine als Mediatoren der Ergebnisse zu identifizieren. Vielmehr sollte der Einfluss eines physiologischen Adipozytokinprofils auf Hypertrophie-assoziierte Signalwege und Zellproteine untersucht werden. Aus diesem Grund wurde auch bewusst darauf verzichtet, Adiponektin- oder Leptinspiegel zu bestimmen.

Ein weiterer Kritikpunkt ergibt sich aus der Adipozytenmischkultur mit einer relativ geringen Zellzahl an Adipozyten. Hier erscheint es jedoch unmöglich Aussagen über das Sekretom der nicht-Adipozyten zu treffen. Insofern bleibt eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch andere Signalmoleküle unklar. Auf der anderen Seite kann man jedoch auch argumentieren, dass die Spiegel an Wachstumsfaktoren im Adipozyten-konditionierten Medium stets höher waren. Da TGF- β und IGF-1 zu den Adipozytokinen zählen, ist trotz niedriger Zellzahlen eine aktive Sekretionsleistung der Adipozyten zu erkennen.

5.6 Ausblick

Adipozytokine nehmen vielfältige Rollen in der Pathogenese kardiovaskulärer- und metabolischer Erkrankungen ein (siehe Kapitel 1.2.4).

Bezüglich der Funktion von Adipozytokinen als zukünftige Biomarker für Körperfettmasse, Körperfettverteilung, Insulinsensitivität oder Funktionszustand des Fettgewebes, besteht eine deutliche potenzielle klinische Relevanz. So korrelieren beispielsweise Leptinspiegel stark mit der Körperfettmasse. Adiponektin hingegen konnte als ein sensibler Biomarker für die Insulinsensitivität beschrieben werden (Blüher, 2012)

In Hinblick auf zukünftige therapeutische Targets in der Behandlung von Adipozytokin-assoziierten Erkrankungen stehen wiederum insbesondere Leptin und Adiponektin im Zentrum wissenschaftlicher Publikationen.

Gualillo zufolge wäre es vorstellbar, zukünftig Leptin-bindende Moleküle therapeutisch einzusetzen, um so den Spiegel von bioaktivem zirkulierenden Leptin zu verringern. Ein Effekt, der für TNF- α -assoziierte Erkrankungen bereits erfolgreich eingesetzt wird.

Ein weiteres therapeutisches Target bildet der Leptinrezeptor. Hier wäre der therapeutische Einsatz von Leptin-Rezeptorblockern denkbar (Gualillo et al., 2007).

Bezüglich Adiponektin konnte gezeigt werden, dass es durch den Einsatz von Angiotensin-Rezeptorblockern möglich ist, die kardio-protektiven Eigenschaften von Adiponektin durch eine Verringerung der Leptin/Adiponektin Ratio zu verstärken (Hass, Oz, Mashavi, & Shargorodsky, 2014). Auch können Thiazolidindione, Insulin-Sensitizer, die in der Behandlung des Diabetes mellitus eingesetzt werden, dazu beitragen Adiponektin-Plasmaspiegel zu erhöhen (Fasshauer, Paschke, & Stumvoll, 2004).

Interessanterweise können Thiazolidindione ebenfalls dazu beitragen, die Leptinkonzentration zu erniedrigen (Kralisch et al., 2005).

6. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Einfluss einer 24-stündigen Behandlung von neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten mit einem Adipozyten-konditionierten Medium auf Hypertrophie-assoziierte Signalwege und Zelleproteine

eingereicht von: Florian Gerhardt

angefertigt am / in: Klinik für Herzchirurgie
Herzzentrum Leipzig, Universität Leipzig
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Friedrich W. Mohr
Strümpellstraße 39, 04289 Leipzig

betreut von: Prof. Dr. med. Stefan Dhein

Mai 2016

Hintergrund:

Übergewicht und Adipositas stellen wesentliche Risikofaktoren in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Als direkte Mediatoren in der Schlüsselstelle zwischen Übergewicht und Adipositas auf der einen Seite und der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen auf der anderen Seite stehen zunehmend Adipozytokine, von Adipozyten und anderen Fettgewebszellen sezernierte bioaktive Moleküle, im Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses. Dabei konnten bislang über 600 verschiedene Moleküle mit zum Teil stark entgegengesetzten biologischen Wirkungen identifiziert werden. Zudem konnten charakteristische Veränderungen im Sekretionsmuster dieser Adipozytokine bei Übergewichtigen, verglichen mit Normalgewichtigen, beobachtet werden.

Die Wirkung einiger weniger Adipozytokine auf die kardiovaskuläre Funktion wurde in den letzten Jahren gut untersucht. Über die Wirkung ganzer Adipozytokine ist bislang jedoch nur wenig bekannt.

Fragestellung:

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Behandlung mit einem Adipozyten-konditionierten Medium eine Auswirkung auf Hypertrophie-assoziierte Signalwege und Zellproteine hat. Weiterhin sollte anhand der Ergebnisse eine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei den beobachteten Ergebnissen um einen hypertrophen oder anti-hypertrophen Effekt handelt.

Methoden:

Für die experimentellen Arbeiten wurden ventrikuläre neonatale Kardiomyozyten für 24 Stunden mit einem Adipozyten-konditionierten Zellkulturmedium behandelt. Für die Gewinnung des Adipozyten-konditionierten Mediums wurden primäre Adipozyten aus dem Nebenhodenfettpolster männlicher Ratten isoliert und kultiviert. Das Zellkulturmedium von drei unabhängigen Präparationen wurde dabei gesammelt und anschließend gepoolt, um einheitliche Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Als Vergleichskontrolle wurden Kardiomyozyten ebenfalls für 24 Stunden mit einem Kardiomyozyten-konditionierten Zellkulturmedium behandelt. Das konditionierte Zellkulturmedium wurde dabei in gleicher Weise von drei unabhängigen Präparationen gewonnen und anschließend gepoolt. Es ergaben sich so zwei Behandlungsgruppen. Eine Gruppe, in der Kardiomyozyten für 24 Stunden mit einem Adipozyten-konditionierten Medium behandelt wurden und eine, in der Kardiomyozyten für 24 Stunden mit einem Kardiomyozyten-konditioniertem Medium behandelt wurden.

Mittels Western-Blot Untersuchungen wurden anschließend die Phosphorylierungsratios von p-ERK/ERK1/2 und p-p38/p38-MAPK, sowie die Proteinexpressionen der beiden Proteine Connexin-43 und β -Aktin untersucht.

Um zusätzlich einen Einblick in die Zusammensetzung der basalen Zellkulturmedien und konditionierten Medien zu gewinnen, wurden zudem ELISA Untersuchungen durchgeführt.

Ergebnisse:

In der Behandlungsgruppe, in der Kardiomyozyten mit dem Adipozyten-konditioniertem Zellkulturmedium behandelt wurden, zeigten die biochemischen Western-Blot Untersuchungen eine signifikante Reduktion in der Phosphorylierungsratio von p-p38/p38-MAPK und eine Reduktion in der Phosphorylierungsratio von p-ERK/ERK-1/2. Zudem konnte eine signifikant verminderte Proteinexpression des zellulären Strukturproteins β -Aktin

festgestellt werden. In der Proteinexpression von Connexin-43 konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

In der Behandlungsgruppe, in der die Kardiomyozyten mit dem Kardiomyozyten-konditionierten Medium behandelt wurden konnten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in den Proteinexpressionen der untersuchten Proteine festgestellt werden. Gleichwohl wurden die untersuchten Proteinen in einem höheren, jedoch nicht signifikanten, Niveau exprimiert.

Bei den ELISA-Untersuchungen stellte sich heraus, dass sowohl Kardiomyozyten, als auch Adipozyten die beiden Wachstumsfaktoren IGF-1 und FGFb in das basale Zellkulturmedium sezernieren, was in einer erhöhten Konzentration in den jeweiligen Zellkulturüberständen resultierte. TGF- β wurde jedoch von beiden Zelltypen verbraucht. Es fanden sich erniedrigte Konzentration in den jeweiligen Zellkulturüberständen.

Schlussfolgerungen:

In Zusammenschau aller Ergebnisse lässt sich festhalten, dass die Behandlung von Kardiomyozyten mit einem physiologischen Adipozytokinprofil einen anti-hypertrophen Effekt hat und sich somit nicht negativ auf die kardiovaskuläre Funktion auswirkt.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, A., Grant, P. J., & Kearney, M. T. (2008). Role of IGF-1 in glucose regulation and cardiovascular disease. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6(8), 1135–1149. <http://doi.org/10.1586/14779072.6.8.1135>
- Abel, E. D., Litwin, S. E., & Sweeny, G. (2008). Cardiac remodeling in obesity. *Physiological Reviews*, 88(2), 389–419. <http://doi.org/10.1152/physrev.00017.2007>.
- Anaya, P., & Moliterno, D. J. (2013). The evolving role of cardiac troponin in the evaluation of cardiac disorders. *Current Cardiology Reports*, 15(11), 420. <http://doi.org/10.1007/s11886-013-0420-0>
- Arner, E., Westermark, P. O., Spalding, K. L., Britton, T., Rydén, M., Frisén, J., ... Arner, P. (2010). Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes*, 59(January), 105–109. <http://doi.org/10.2337/db09-0942>.
- Bairwa, S. C., Rajapurohitam, V., Gan, X. T., Mangat, R., Proctor, S. D., & Karmazyn, M. (2016). Cardiomyocyte Antihypertrophic Effect of Adipose Tissue Conditioned Medium from Rats and Its Abrogation by Obesity is Mediated by the Leptin to Adiponectin Ratio. *PLoS ONE*, 11(1), e0145992. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0145992>
- Balasubramanian, S., Mani, S. K., Kasiganesan, H., Baicu, C. C., & Kuppuswamy, D. (2010). Hypertrophic Stimulation Increases b-actin Dynamics in Adult Feline Cardiomyocytes. *PLoS ONE*, 5(7), e11470. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0011470>
- Bays, H. E., González-Campoy, J. M., Bray, G. A., Kitabchi, A. E., Bergman, D. A., Schorr, A. B., ... Henry, R. R. (2008). Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6(3), 343–368. <http://doi.org/10.1586/14779072.6.3.343>
- Betz, M. J., & Enerbäck, S. (2015). Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far. *Diabetes*, 64(7), 2352–2360. <http://doi.org/10.2337/db15-0146>

- Bibiloni, M. D. M., Pons, A., & Tur, J. A. (2013). Prevalence of overweight and obesity in adolescents: a systematic review. *ISRN Obesity*, 2013, 14. <http://doi.org/10.1155/2013/392747>
- Blüher, M. (2012). Clinical Relevance of Adipokines. *Diabetes and Metabolism Journal*, 36(5), 317–327. <http://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.5.317>
- Blüher, M. (2014). Das fettgewebe - Ein endokrines Organ. *Internist*, 55(6), 687–698. <http://doi.org/10.1007/s00108-014-3456-3>
- Bogoyevitch, M. A., & Court, N. W. (2004). Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cellular Signalling*, 16(12), 1345–1354. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.05.004>
- Bogoyevitch, M. A., Glennon, P. E., Andersson, M. B., Clerk, A., Lazou, A., Marshall, C. J., ... Sugden, P. H. (1994). Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes: The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 269(2), 1110–1119.
- Bueno, O. F., De Windt, L. J., Lim, H. W., Tymitz, K. M., Witt, S. A., Kimball, T. R., & Molkentin, J. D. (2001). The Dual-Specificity Phosphatase MKP-1 Limits the Cardiac Hypertrophic Response In Vitro and In Vivo. *Circulation Research*, 88(1), 88–96. <http://doi.org/10.1161/01.RES.88.1.88>
- Clerk, A., Aggeli, I.-K. S., Stathopoulou, K., & Sugden, P. H. (2006). Peptide growth factors signal differentially through protein kinase C to extracellular signal-regulated kinases in neonatal cardiomyocytes. *Cellular Signalling*, 18(2), 225–235. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.04.005>
- Clerk, A., & Sugden, P. H. (2004). Signaling through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade in cardiac myocytes. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 82(6), 603–609. <http://doi.org/10.1139/o04-110>

- Dhein, S. (2014). Fat and the Heart: A More and More Complex Interplay. *Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, 62(7), 543–546. <http://doi.org/10.1055/s-0034-1377064>
- Dobaczewski, M., Chen, W., & Frangogiannis, N. G. (2011). Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(4), 600–606. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.033>
- Duffy, H. S., Fort, A. G., & Spray, D. C. (2006). Cardiac connexins: Genes to Nexus. *Advances in Cardiology*, 42, 1–17. <http://doi.org/10.1159/000092550>
- Ebrahimi-Mamaeighani, M., Mohammadi, S., Arefhosseini, S. R., Fallah, P., & Bazi, Z. (2015). Adiponectin as a potential biomarker of vascular disease. *Vascular Health and Risk Management*, 11, 55–70. <http://doi.org/10.2147/VHRM.S48753>
- Enerbäck, S. (2010). Human Brown Adipose Tissue. *Cell Metabolism*, 11(4), 248–252. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.008>
- Fasshauer, M., & Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), 461–470. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.014>
- Fasshauer, M., Paschke, R., & Stumvoll, M. (2004). Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. *Biochimie*, 86(11), 779–784. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.016>
- Fernyhough, M. E., Vierck, J. L., Hausman, G. J., Mir, P. S., Okine, E. K., & Dodson, M. V. (2004). Primary adipocyte culture: adipocyte purification methods may lead to a new understanding of adipose tissue growth and development. *Cytotechnology*, 46(2-3), 163–172. <http://doi.org/10.1007/s10616-005-2602-0>
- Finucane, M. M., Stevens, G. A., Cowan, M., Danaei, G., Lin, J. K., Paciorek, C. J., ... Ezzati, M. (2011). National, regional, and global trends in body mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet (London, England)*, 377(9765), 557–567. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62037-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62037-5)

- Fitzgibbons, T. P., & Czech, M. P. (2014). Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations. *Journal of the American Heart Association*, 3(2), 1–16. <http://doi.org/10.1161/JAHA.113.000582>
- Foncea, R., Andersson, M., Ketterman, A., Blakesley, V., Sapag-Hagar, M., Sugden, P. H., ... Lavandero, S. (1997). Insulin-like Growth Factor-I Rapidly Activates Multiple Signal Transduction Pathways in Cultured Rat Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19115–19124. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19115>
- Frost, L., Hune, L. J., & Vestergaard, P. (2005). Overweight, obesity and risk factors for atrial fibrillation or flutter-secondary publication. The cohort study Diet, Cancer and Health. *Ugeskrift for laeger*, 167(37), 3507–3509.
- Garrington, T. P., & Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2), 211–218. [http://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80028-3](http://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80028-3)
- Ghantous, C. M., Azrak, Z., Hanache, S., Abou-Kheir, W., & Zeidan, A. (2015). Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 13. <http://doi.org/dx.doi.org/10.1155/2015/534320>
- Glennon, P. E., Sugden, P. H., & Poole-Wilson, P. A. (1995). Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J.Mol.Med.*, 73(11), 496–499. <http://doi.org/10.1007/s001090050275>
- Grundy, S. M. (2015). Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.10.004>
- Gualillo, O., González-Juanatey, J. R., & Lago, F. (2007). The Emerging Role of Adipokines as Mediators of Cardiovascular Function: Physiologic and Clinical Perspectives. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 17(8), 275–283. <http://doi.org/10.1016/j.tcm.2007.09.005>

- Hajer, G. R., van Haeften, T. W., & Visseren, F. L. J. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, 29(24), 2959–2971. <http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn387>
- Hass, A., Oz, H., Mashavi, M., & Shargorodsky, M. (2014). Role of RAAS and adipokines in cardiovascular protection: Effect of different doses of angiotensin II receptor blocker on adipokines level in hypertensive patients. *Journal of the American Society of Hypertension*, 8(10), 709–714. <http://doi.org/10.1016/j.jash.2014.07.033>
- Hatem, S. N., & Sanders, P. (2014). Epicardial adipose tissue and atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*, 102(2), 205–213. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvu045>
- Hefti, M. A., Harder, B. A., Eppenberger, H. M., & Schaub, M. C. (1997). Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(11), 2873–2892. <http://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0523>
- Heineke, J., & Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(8), 589–600. <http://doi.org/10.1038/nrm1983>
- Iacobellis, G. (2014). Epicardial adipose tissue in endocrine and metabolic diseases. *Endocrine*, 46(1), 8–15. <http://doi.org/10.1007/s12020-013-0099-4>
- Itoh, N., & Ohta, H. (2013). Pathophysiological roles of FGF signaling in the heart. *Frontiers in Physiology*, 4(247), 2–5. <http://doi.org/10.3389/fphys.2013.00247>
- James, P. T. (2004). Obesity: The Worldwide Epidemic. *Clinics in Dermatology*, 22, 276–280. <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.01.010>
- James, P. T., Rigby, N., & Leach, R. (2004). The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*, 11(1), 3–8. <http://doi.org/10.1097/01.hjr.0000114707.27531.48>

- Kang, S., Chemaly, E. R., Hajjar, R. J., & Lebeche, D. (2011). Resistin Promotes Cardiac Hypertrophy via the AMP-activated Protein Kinase/Mammalian Target of Rapamycin (AMPK/mTOR) and c-Jun N-terminal Kinase/Insulin Receptor Substrate 1 (JNK/IRS1) Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18465–18473. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.200022>
- Kappelle, P. J. W. H., Dullaart, R. P. F., van Beek, A. P., Hillege, H. L., & Wolffenbuttel, B. H. R. (2012). The plasma leptin/adiponectin ratio predicts first cardiovascular event in men: A prospective nested case-control study. *European Journal of Internal Medicine*, 23(8), 755–759. <http://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.06.013>
- Kardami, E., Jiang, Z.-S., Jimenez, S. K., Hirst, C. J., Sheikh, F., Zahradka, P., & Cattini, P. A. (2004). Fibroblast growth factor 2 isoforms and cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 63(3), 458–466. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.04.024>
- Katrakha, I. A. (2013). Human Cardiac Troponin Complex. Structure and Functions. *Biochemistry*, 78(13), 1447–1465. <http://doi.org/10.1134/S0006297913130063>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2014). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548–2556. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kim, M., Oh, J. kyun, Sakata, S., Liang, I., Park, W., Hajjar, R. J., & Lebeche, D. (2008). Role of resistin in cardiac contractility and hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(2), 270–280. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.05.006>
- Kim, S. H., Després, J.-P., & Koh, K. K. (2015). Obesity and cardiovascular disease: friend or foe? *European Heart Journal*, 1–11. <http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv509>
- Klötting, N., & Blüher, M. (2014). Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 15(4), 277–287. <http://doi.org/10.1007/s11154-014-9301-0>

- Kostin, S., Dammer, S., Hein, S., Klovekorn, W. P., Bauer, E. P., & Schaper, J. (2004). Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovascular Research*, 62(2), 426–436. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.010>
- Kralisch, S., Klein, J., Bluher, M., Paschke, R., Stumvoll, M., & Fasshauer, M. (2005). Therapeutic perspectives of adipocytokines. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 6(6), 863–872. <http://doi.org/10.1517/14656566.6.6.863>
- Kumar, N. M., & Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*, 84(3), 381–388. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81282-9](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81282-9)
- Lau, D. C. W., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P. E., & Verma, S. (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 288(5), H2031–H2041. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.01058.2004>
- Lavie, C. J., Sharma, A., Alpert, M. A., Schutter, A. De, Lopez-Jimenez, F., Milani, R. V., & Ventura, H. O. (2015). Update on Obesity and Obesity paradox in Heart Failure. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 58(4), 393–400. <http://doi.org/10.1016/j.pcad.2015.12.003>
- Li, Y., Cai, X., Guan, Y., Wang, L., Wang, S., Li, Y., ... Su, G. (2016). Adiponectin Upregulates MiR-133a in Cardiac Hypertrophy through AMPK Activation and Reduced ERK1/2 Phosphorylation. *Plos One*, 11(2), e0148482. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148482>
- Liang, Q., & Molkentin, J. D. (2003). Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: Dichotomy between cultured myocytes and animal models. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(12), 1385–1394. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2003.10.001>

- Lin, Y. K., Chen, Y. C., Chen, J. H., Chen, S. A., & Chen, Y. J. (2012). Adipocytes modulate the electrophysiology of atrial myocytes: Implications in obesity-induced atrial fibrillation. *Basic Research in Cardiology*, 107(5), 1–11. <http://doi.org/10.1007/s00395-012-0293-1>
- Lin, Y.-K., Chen, Y.-C., Huang, J.-H., Lin, Y.-J., Huang, S.-S., Chen, S.-A., & Chen, Y.-J. (2013). Leptin modulates electrophysiological characteristics and isoproterenol-induced arrhythmogenesis in atrial myocytes. *Journal of Biomedical Science*, 20(1), 94. <http://doi.org/10.1186/1423-0127-20-94>
- Madani, S., De Girolamo, S., Muñoz, D. M., Li, R.-K., & Sweeney, G. (2006). Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, 69(3), 716–725. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.11.022>
- Mattu, H. S., & Randeve, H. S. (2013). Role of adipokines in cardiovascular disease. *Journal of Endocrinology*, 216(1), T17–T36. <http://doi.org/10.1530/JOE-12-0232>
- Molica, F., Morel, S., Kwak, B. R., Rohner-Jeanrenaud, F., & Steffens, S. (2015). Adipokines at the crossroad between obesity and cardiovascular disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 113(3), 553–566. <http://doi.org/10.1160/TH14-06-0513>
- Murphy, N. F., MacIntyre, K., Stewart, S., Hart, C. L., Hole, D., & McMurray, J. J. V. (2006). Long-term cardiovascular consequences of obesity: 20-Year follow-up of more than 15 000 middle-aged men and women (the Renfrew-Paisley study). *European Heart Journal*, 27(1), 96–106. <http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi506>
- Muslin, A. J. (2008). MAPK Signaling in Cardiovascular Health and Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets Anthony. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 115(7), 203–218. <http://doi.org/10.1042/CS20070430>.MAPK
- Mutlak, M., & Kehat, I. (2015). Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 149. <http://doi.org/10.3389/fphar.2015.00149>

- Nakamura, K., Fuster, J. J., & Walsh, K. (2014). Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *Journal of Cardiology*, 63(4), 250–259. <http://doi.org/10.1016/j.jjcc.2013.11.006>.
- Nickola, M. W., Wold, L. E., Colligan, P. B., Wang, G. J., Samson, W. K., & Ren, J. (2000). Leptin attenuates cardiac contraction in rat ventricular myocytes. Role of NO. *Hypertension*, 36(4), 501–505. <http://doi.org/10.1161/01.HYP.36.4.501>
- Norata, G. D., Raselli, S., Grigore, L., Garlaschelli, K., Dozio, E., Magni, P., & Catapano, A. L. (2007). Leptin: Adiponectin Ratio Is an Independent Predictor of Intima Media Thickness of the Common Carotid Artery. *Stroke*, 38(10), 2844–2846. <http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.485540>
- Northcott, J. M., Yeganeh, A., Taylor, C. G., Zahradka, P., & Wigle, J. T. (2012). Adipokines and the cardiovascular system: mechanisms mediating health and disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 90(8), 1029–1059. <http://doi.org/10.1139/y2012-053>
- Ouwens, D. M., Sell, H., Greulich, S., & Eckel, J. (2010). The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(9), 2223–2234. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01141.x>
- Palanivel, R., Vu, V., Park, M., Fang, X., & Sweeney, G. (2008). Differential impact of adipokines derived from primary adipocytes of wild-type versus streptozotocin-induced diabetic rats on glucose and fatty acid metabolism in cardiomyocytes. *The Journal of Endocrinology*, 199(3), 389–97. <http://doi.org/10.1677/JOE-08-0336>
- Polontchouk, L., Ebelt, B., Jackels, M., & Dhein, S. (2002). Chronic effects of endothelin 1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(1), 87–89. <http://doi.org/10.1096/fj.01-0381fje>

- Quitschke, W. W., Lin, Z.-Y., DePonti-Zilli, L., & Paterson, B. M. (1989). The beta actin promoter. High levels of transcription depend upon a CCAAT binding factor. *Journal of Biological Chemistry*, 264(16), 9539–9546.
- Rajapurohitam, V., Gan, X. T., Kirshenbaum, L. A., & Karmazyn, M. (2003). The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation Research*, 93(4), 277–279. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000089255.37804.72>
- Rojas Gomez, D. M., Schulte, J. S., Mohr, F. W., & Dhein, S. (2008). Alpha-1-adrenoceptor subtype selective regulation of connexin 43 expression in rat cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 377(1), 77–85. <http://doi.org/10.1007/s00210-007-0244-9>
- Ronti, T., Lupattelli, G., & Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology*, 64(4), 355–365. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02474.x>
- Rothe, S., Busch, A., Bittner, H., Kostelka, M., Dohmen, P. M., Mohr, F.-W., & Dhein, S. (2014). Body mass index affects connexin43 remodeling in patients with atrial fibrillation. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, 62(7), 547–553. <http://doi.org/10.1055/s-0034-1372334>
- Sacks, H. S., & Fain, J. N. (2007). Human epicardial adipose tissue: A review. *American Heart Journal*, 153(6), 907–917. <http://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.03.019>
- Salameh, A., & Dhein, S. (2011). Adrenergic control of cardiac gap junction function and expression. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383(4), 331–346. <http://doi.org/10.1007/s00210-011-0603-4>
- Salameh, A., Frenzel, C., Boldt, A., Ressler, B., Glawe, I., Schulte, J., ... Dhein, S. (2006). Subchronic alpha- and beta-adrenergic regulation of cardiac gap junction protein expression. *Faseb J*, 20(2), 365–367. <http://doi.org/10.1096/fj.05-4871fje>

- Seidel, T., Salameh, A., & Dhein, S. (2010). A simulation study of cellular hypertrophy and connexin lateralization in cardiac tissue. *Biophysical Journal*, 99(9), 2821–2830. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.09.010>
- Sharma, A., Lavie, C. J., Borer, J. S., Vallakati, A., Goel, S., Lopez-Jimenez, F., ... Lazar, J. M. (2015). Meta-Analysis of the Relation of Body Mass Index to All-Cause and Cardiovascular Mortality and Hospitalization in Patients With Chronic Heart Failure. *The American Journal of Cardiology*, 115(10), 1428–1434. <http://doi.org/10.1016/j.amjcard.2015.02.024>
- Shibata, R., Ouchi, N., Ito, M., Kihara, S., Shiojima, I., Pimentel, D. R., ... Walsh, K. (2004). Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nature Medicine*, 10(12), 1384–1389. <http://doi.org/10.1038/nm1137>
- Stevens, G. A., Singh, G. M., Lu, Y., Danaei, G., Lin, J. K., Finucane, M. M., ... Ezzati, M. (2012). National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Population Health Metrics*, 10(22), 1–16. <http://doi.org/10.1186/1478-7954-10-22>
- Strnisková, A., Barancík, M., & Ravingerová, T. (2002). Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Regulation of Cellular Processes. *General Physiology Biophysics*, 21, 231–255. <http://doi.org/10.1177/1947601913485414>
- Sugden, P. H. (2001). Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *Annals of Medicine*, 33(9), 611–622.
- Takemura, G., Kanoh, M., Minatoguchi, S., & Fujiwara, H. (2013). Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart - A critical review from definition and classification of cell death. *International Journal of Cardiology*, 167(6), 2373–2386. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.163>
- Teunissen, B. E. J., & Bierhuizen, M. F. A. (2004). Transcriptional control of myocardial connexins. *Cardiovascular Research*, 62(2), 246–255. <http://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.011>

- Van De Voorde, J., Pauwels, B., Boydens, C., & Decaluwé, K. (2013). Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 62(11), 1513–1521. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.06.004>
- Van Gaal, L. F., Mertens, I. L., & De Block, C. E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444(7121), 875–880. <http://doi.org/10.1038/nature05487>
- Vu, V., Kim, W., Fang, X., Liu, Y. T., Xu, A., & Sweeney, G. (2007). Coculture with Primary Visceral Rat Adipocytes from Control But Not Streptozotocin-Induced Diabetic Animals Increases Glucose Uptake in Rat Skeletal Muscle Cells: Role of Adiponectin. *Endocrinology*, 148(9), 4411–4419. <http://doi.org/10.1210/en.2007-0020>
- Wang, Y., Huang, S., Sah, V. P., Ross, J. J., Brown, J. H., Han, J., & Chien, K. R. (1998). Cardiac Muscle Cell Hypertrophy and Apoptosis Induced by Distinct members of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Family. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2161–2168.
- White, U. A., & Tchoukalova, Y. D. (2014). Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochim Biophys Acta*, 1842(3), 377–392. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.006>.Sex
- Wilkins, B. J., & Molkentin, J. D. (2004). Calcium-calcieneurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(4), 1178–1191. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.121>
- Yokota, T., & Wang, Y. (2016). p38 MAP kinases in the heart. *Gene*, 575(2), 369–376. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.030>

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Adipozytokine und deren Funktionen auf den menschlichen Organismus.	6
Abbildung 2: Veränderungen in der Adipozytokinsekretion in gesundem und dysfunktionalem Fettgewebe.....	8
Abbildung 3: Adipozytokine und deren Wirkung auf das kardiovaskuläre System.....	10
Abbildung 4: Vereinfachter Überblick der Signaltransduktionssysteme MAPKs und Calcineurin/Calmodulin.	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Adipozytenisolation aus dem Nebenhodenfettpolster der Ratte.....	47
Abbildung 6: Schematische Darstellung der beiden Behandlungsgruppen.....	50
Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer Western-Blot-Apparatur.....	61
Abbildung 8: Schematischer Ablauf eines Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest.	67
Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahme eines repräsentativen Bildausschnitts ventrikulärer Kardiomyozyten in Zellkultur.....	69
Abbildung 10: Immunhistologische Aufnahme ventrikulärer Kardiomyozyten.....	72
Abbildung 11: Ermittelte Schlagfrequenzen.....	74
Abbildung 12: Ermittelte Schlagfrequenzen.....	75
Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahme repräsentativer Bildausschnitte von Adipozyten.	76
Abbildung 14: Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten.....	78
Abbildung 15: Expression von Connexin-43.....	78
Abbildung 16: Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit KKM behandelten Kardiomyozyten.....	79
Abbildung 17: Expression von Connexin-43.....	80
Abbildung 18: Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten.....	81
Abbildung 19: Expression von β -Aktin.....	82
Abbildung 20: Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit KKM behandelten Kardiomyozyten.....	83
Abbildung 21: Expression von β -Aktin.....	84

Abbildung 22: Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten.	86
Abbildung 23: Expression von p-ERK/ERK-1/2.	87
Abbildung 24: Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit KKM behandelten Kardiomyozyten.	88
Abbildung 25: Expression von p-ERK/ERK-1/2.	89
Abbildung 26: Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit AKM behandelten Kardiomyozyten.	90
Abbildung 27: Expression von p-p38/p38-MAPK.	91
Abbildung 28: Repräsentativer Western-Blot von unbehandelten und mit KKM behandelten Kardiomyozyten.	92
Abbildung 29: Expression von p-p38/p38-MAPK.	93
Abbildung 30: Konzentration von TGF- β	95
Abbildung 31: Konzentration von IGF-1.	96
Abbildung 32: Konzentration von FGFb.	97
Tabelle 1: BMI Klassifikationen	1
Tabelle 2: Übersicht über die Funktionen einiger Adipozytokine.	5
Tabelle 3: Wirkungen von Adiponektin und Leptin auf Kardiomyozyten.	11
Tabelle 4: Verwendete allgemeine Geräte	17
Tabelle 5: Verwendete Geräte für Zellkultur	18
Tabelle 6: Verwendete Geräte für die biochemischen Analysen	18
Tabelle 7: Verwendete allgemeine Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel	19
Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel für die Zellkultur	20
Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel für die biochemischen Analysen.	21
Tabelle 10: Verwendete allgemeine Chemikalien.	22
Tabelle 11: Verwendete Biochemikalien für die Zellkultur.	23
Tabelle 12: Verwendete Medikamente für die Narkose der Tiere	24
Tabelle 13: Verwendete Chemikalien für die biochemischen Analysen.	24
Tabelle 14: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die biochemischen Analysen .	25
Tabelle 15: Chemikalien für die Histologie und Immunhistologie	27
Tabelle 16: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistologie	27

Tabelle 17: Pipettierschema für RIPA-Lysepuffer	37
Tabelle 18: Verwendete Kommerzielle Kits	43
Tabelle 19: Verwendete Computersoftware	43
Tabelle 20: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.....	53
Tabelle 21: Standard-Verdünnungsreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung..	56
Tabelle 22: Chemikalien für Trenngel und Sammelgel.	58
Tabelle 23: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.....	62

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Florian Gerhardt
Geburtsdatum und -ort: 05.12.1989 in Potsdam
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

08/1996 – 06/2001 Grundschule „Ludwig Renn“, Potsdam
08/2001 – 06/2009 „Humboldt Gymnasium“, Potsdam
08/2006 – 07/2007 Floyd E. Kellam High School, Virginia Beach, USA

Zivildienst

09/2009 – 05/2010 Untere Denkmalschutzbehörde Potsdam

Studium

10/2010 – 09/2012 Universität Leipzig, Medizinische Fakultät
 Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt
09/2012 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2012 – 09/2015 Universität Leipzig, Medizinische Fakultät
 Humanmedizin, klinischer Abschnitt
10/2015 Schriftlicher Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
seit 11/2015 Praktisches Jahr, Universitätsklinikum Leipzig und
 Klinikum St. Georg, Leipzig

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Wilhelm Mohr; Direktor des Herzzentrums Leipzig, für die Möglichkeit, am Herzzentrum meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Stefan Dhein für die Vergabe des interessanten Themas und die Ermöglichung der Promotion in den Forschungslaboren der Klinik für Herzchirurgie am Herzzentrum, sowie für die Betreuung während meiner Arbeit im Labor. Seine Anregungen, Vorschläge und Unterstützungen halfen mir beim Schreiben dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Franziska Schlegel und Frau Sabine Steinbach für die sorgfältige und geduldige Einarbeitung, sowie die Unterstützung bei Fragen und Problemen. Zudem möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Forschungslabors bedanken, die mir jederzeit hilfsbereit zur Seite standen.

Ein weiterer ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, ohne die das Studium nicht möglich gewesen wäre, sowie an meine Freundin Kristin für die Geduld und Ermutigungen.